

# Charakterisierung neuer potenzieller Biomarker bei definierten gastrointestinalen Tumorerkrankungen

Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Falkenstein, Charline Madeleine

aus Hadamar

Gießen 2025

**Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Medizinische Klinik und Poliklinik II sowie medizinische Klinik IV für Innere Medizin,

Gutachter/in: Prof. Dr. Hardt, Philip

Gutachter/in: Prof. Dr. Schneider, Martin A.

Tag der Disputation: 05.02.2025

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort, Datum

Unterschrift

Entscheidend auf dem Weg zum Ziel, sind die Menschen die uns dabei begleiten

Gewidmet meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Abkürzungsverzeichnis .....                               | I  |
| Abbildungsverzeichnis .....                               | IV |
| Tabellenverzeichnis.....                                  | VI |
| 1 Einleitung .....  | 1  |
| 2 Literaturübersicht .....                                | 3  |
| 2.1 Geschichte des Tumormarker M2-PK.....                 | 3  |
| 2.2 Das Tumor-Metabolom .....                             | 6  |
| 2.2.1 Gewebespezifische Isomere der Pyruvat-Kinase .....  | 6  |
| 2.2.2 M2-PK-Expression in Tumorzellen .....               | 7  |
| 2.2.3 M2-PK in Tumorgeweben als diagnostisches Tool ..... | 11 |
| 2.3 Gastrointestinale Tumorerkrankungen .....             | 12 |
| 2.3.1 Das Magenkarzinom .....                             | 14 |
| 2.3.2 Das Pankreas-Karzinom.....                          | 15 |
| 2.3.3 Darm-Karzinome.....                                 | 18 |
| 2.3.4 Zusammenfassung.....                                | 21 |
| 2.4 Ziel der Arbeit .....                                 | 23 |
| 3 Material und Methode .....                              | 24 |
| 3.1 Studiendesign.....                                    | 24 |
| 3.2 Materialgewinnung.....                                | 24 |
| 3.3 Probenaufarbeitung und Lagerung .....                 | 24 |
| 3.4 Ein- und Ausschlusskriterien.....                     | 25 |
| 3.5 Datenschutz .....                                     | 27 |
| 3.6 Kooperation und Labor.....                            | 27 |
| 3.7 Testprinzip des ELISA .....                           | 27 |
| 3.7.1 Testung der Stuhlproben auf Tu M2-PK.....           | 29 |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 3.7.1.1 | Messbereich und Präzision.....  | 29 |
| 3.7.1.2 | Messung TU M2-PK.....   | 30 |
| 3.7.2   | Testung der Plasmaproben.....   | 31 |
| 3.7.2.1 | Messbereich und Präzision der Plasmaproben.....                       | 31 |
| 3.7.2.2 | Messung der Plasmaproben.....   | 32 |
| 3.7.3   | Antikörperbestand.....  | 33 |
| 3.7.4   | Austestung der Clone-Varianten.....                                   | 34 |
| 4       | Ergebnisse: Statistische Analyse.....                                 | 37 |
| 4.1     | Gesund vs. Karzinom.....  | 38 |
| 4.1.1   | Deskriptive Statistik M2-PK im Stuhl.....                             | 38 |
| 4.1.2   | Deskriptive Statistik für weitere Klonkombinationen im Stuhl.....     | 38 |
| 4.1.3   | Statistischer Vergleich der weiteren Klonkombinationen im Stuhl.....  | 39 |
| 4.1.4   | Deskriptive Statistik M2-PK im Plasma.....                            | 41 |
| 4.1.5   | Deskriptive Statistik für weitere Klonkombinationen im Plasma.....    | 41 |
| 4.1.6   | Statistischer Vergleich der weiteren Klonkombinationen im Plasma..... | 42 |
| 4.2     | Gesund vs. Magen-/Pancreas-/ Darm-Karzinom.....                       | 44 |
| 4.2.1   | M2-PK im Stuhl 4 Gruppen.....   | 44 |
| 4.2.2   | Weitere Klonkombinationen im Stuhl 4 Gruppen.....                     | 45 |
| 4.2.3   | Statistischer Vergleich der weiteren Klonkombinationen im Stuhl.....  | 48 |
| 4.2.4   | M2-PK im Plasma 4 Gruppen.....  | 49 |
| 4.2.5   | Weitere Klonkombinationen im Plasma 4 Gruppen.....                    | 50 |
| 4.2.6   | Statistischer Vergleich der weiteren Klonkombinationen im Plasma..... | 53 |
| 5       | Diskussion.....   | 54 |
| 5.1     | M2-PK im Stuhl bei Gesunden vs. Patienten mit Karzinom.....           | 54 |
| 5.2     | M2-PK im Plasma bei Gesunden vs. Patienten mit Karzinom.....          | 55 |
| 5.3     | Limitationen und methodische Einschränkungen.....                     | 56 |
| 5.4     | Ausblick.....   | 57 |

|   |                           |    |
|---|---------------------------|----|
| 6 | Zusammenfassung .....     | 60 |
| 7 | Summary .....             | 62 |
| 8 | Literaturverzeichnis..... | 64 |
| 9 | Danksagung.....           | 72 |

## Abkürzungsverzeichnis

|         |  |
|---------|--|
| ADP     | Adenosindiphosphat                                   |
| ATP     | Adenosintriphosphat                                  |
| Ca      | Carcinom   |
| CA 19-9 | Carbohydrate Antigen 19-9                            |
| CEA     | Carcinoembryonales Antigen                           |
| CED     | Chronisch-entzündliche Darmerkrankung                |
| CRN     | Kolorektaler Neoplasien                              |
| CT      | Computertomographie                                  |
| DS-GVO  | Datenschutz-Grundverordnung                          |
| EGFR    | Epidermal Growth Factor Receptor                     |
| ELISA   | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay                    |
| EMT     | Epithelial-Mesenchymale Transition                   |
| ERCP    | Endoskopische Retrograde Cholangiopankreatikographie |
| FAP     | Familiäre Adenomatöse Polypose                       |
| FC      | Fäkales Calprotectin                                 |
| FOB     | Fäkales Okkultes Blut                                |
| FOBT    | Fecal Occult Blood Test                              |
| GERD    | Gastroösophageale Refluxkrankheit                    |
| GI      | Gastrointestinal                                     |
| GIST    | Gastrointestinalen Stromatumor                       |
| GSH     | Glutathion   |
| HCC     | Hepatozelluläres Karzinom                            |
| HIF-1   | Hypoxia-Inducible Factor 1                           |

|       |                                      |
|-------|--------------------------------------|
| HRE   | Hypoxie-Reaktions-Element            |
| IBD   | Inflammatory Bowel Disease           |
| ICC   | Intrahepatischem Cholangiokarzinom   |
| KRK   | Kolorektalkarzinom                   |
| LDH   | Laktatdehydrogenase                  |
| LR    | Likelihood Ratios                    |
| M2-PK | M2-Pyruvatkinase                     |
| MRT   | Magnetresonanztomographie            |
| MSLN  | Mesothelin                           |
| NADPH | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat |
| NEK2  | Serin/Threonine-Protein Kinase       |
| NPV   | Negativen Prädiktiven Wert           |
| NPV   | Net Present Value                    |
| NSCLC | Nicht-Kleinzelligem Lungenkarzinom   |
| OD    | Optischen Dichte                     |
| PC    | Pankreaskarzinome                    |
| PDAC  | Pankreatisch-Duktales Adenokarzinom  |
| PDK1  | Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase         |
| PET   | Positronen-Emissions-Tomographie     |
| PHD3  | Prolyl-4- Hydroxylase Domain 3       |
| PK    | Pyrovat-Kinase                       |
| PKM2  | Pyrovatkinase M2                     |
| PPV   | Positiven Prädiktiven Wert           |
| PSA   | Prostata-Spezifisches Antigen        |

|             |  |
|-------------|--|
| RCC         | Nierenzellkarzinomen                     |
| SCC         | Squamous Cell Carcinoma Antigen          |
| TAC         | Test Application Components              |
| TCA- Zyklus | Zitronensäurezyklus                      |
| UC          | Gastrointestinalen Entzündung            |
| UKGM        | Universitätsklinikum Giessen und Marburg |
| VEGFR       | Vascular Endothelial Growth Factor       |
| VK          | Variationskoeffizient                    |

## Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 1: Tetramere und dimere Form der M2-PK bei der Verstoffwechslung von Glukose in Tumorzellen (eigene Abbildung in Anlehnung an (Mazurek S. , 2010, S. 202)..... | 4  |
| Abbildung 2: Regulation des Stoffwechsels in Tumorzellen durch M2-PK (eigene Abbildung in Anlehnung an (Tamada, Suematsu, & Saya, 2012, S. o.S.).....                    | 9  |
| Abbildung 3: Nicht-glykolytische Funktionen von M2-PK im Nukleus (eigene Abbildung in Anlehnung an (Tamada, Suematsu, & Saya, 2012, S. o.S.).....                        | 10 |
| Abbildung 4: Sandwich-ELISA (eigene Abbildung in Anlehnung an (Aryal, 2020).....   | 28 |
| Abbildung 5: Konzentration M2-PK in U/ml im Stuhl: Gesund vs. Karzinompatienten  | 38 |
| Abbildung 6: Konzentration Klonkombination B mit C im Stuhl: Gesund vs. Karzinompatienten .....  | 40 |
| Abbildung 7: Konzentration Klonkombination D mit D im Stuhl: Gesund vs. Karzinompatienten .....  | 40 |
| Abbildung 8: Konzentration M2-PK in U/ml im Plasma: Gesund vs. Karzinompatienten .....   | 41 |
| Abbildung 9: Konzentration Klonkombination C mit D im Plasma: Gesund vs. Karzinompatienten .....   | 43 |
| Abbildung 10: Konzentration Klonkombination C mit C im Plasma: Gesund vs. Karzinompatienten .....  | 43 |
| Abbildung 11: Konzentration Klonkombination D mit C im Plasma: Gesund vs. Karzinompatienten .....  | 43 |
| Abbildung 12: Konzentration von M2- PK im Stuhl: Gesund vs. Magen-/Pancreas-/Darm-Karzinom .....   | 44 |

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 13: Konzentration verschiedener Klonkombinationen im Stuhl: Gesund vs. Magen-/Pancreas-/ Darm-Karzinom, einzeln aufgeführt .....  | 46 |
| Abbildung 14: Konzentration verschiedener Klonkombinationen im Stuhl: Gesund vs. Magen-/Pancreas-/ Darm-Karzinom, Übersicht.....            | 47 |
| Abbildung 15: Konzentration Klonkombination D mit D im Stuhl: Gesund vs. Magen-/Pancreas-/ Darm-Karzinom.....                               | 48 |
| Abbildung 16: Konzentration M2- PK im Plasma: Gesund vs. Magen-/Pancreas-/ Darm-Karzinom.....   | 49 |
| Abbildung 17: Konzentration verschiedener Klonkombinationen im Plasma: Gesund vs. Magen-/Pancreas-/ Darm-Karzinom, einzeln aufgeführt ..... | 51 |
| Abbildung 18: Konzentration verschiedener Klonkombinationen im Plasma: Gesund vs. Magen-/Pancreas-/ Darm-Karzinom, Übersicht.....           | 52 |
| Abbildung 19: Konzentration Klonkombination C mit D im Plasma: Gesund vs. Magen-/Pancreas-/ Darm-Karzinom.....                              | 53 |

## Tabellenverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Tabelle 1: Arten der Pyruvat-Kinase und ihr Vorkommen (eigene Darstellung in Anlehnung an (Zahra, Dey, Ashish, Mishra, & Pandey, 2020) ..... | 6  |
| Tabelle 2: Tumormarker bei gastrointestinalen Tumoren (eigene Darstellung in Anlehnung an (Herold, 2019).....                                | 22 |
| Tabelle 3: Ein- und Ausschlusskriterien .....  | 25 |
| Tabelle 4: Vorbereitung der Messungen der Stuhlproben (eigene Darstellung in Anlehnung an (ScheBo Biotech AG) .....                          | 30 |
| Tabelle 5: Testdurchführung Tu M2-PK-Test .....  | 30 |
| Tabelle 6: Vorbereitung der Messungen der Plasmaproben (eigene Darstellung in Anlehnung an (ScheBo Biotech AG) .....                         | 32 |
| Tabelle 7: Testdurchführung Plasmaproben .....   | 32 |
| Tabelle 8: Antikörper unkonjugiert.....  | 33 |
| Tabelle 9: Antikörper biotinyliert .....   | 34 |
| Tabelle 10: Zusammensetzung PBS.....   | 35 |
| Tabelle 11: Testdurchführung der Clone-Varianten .....   | 36 |
| Tabelle 12: Konzentration verscheidender Klonkombinationen im Stuhl: Gesund vs. Karzinompatienten .....                                      | 39 |
| Tabelle 13: Konzentration verschiedenen Klonkombinationen im Plasma: Gesund vs. Karzinompatienten .....                                      | 42 |
| Tabelle 14: Konzentration verschiedener Klonkombinationen im Stuhl: Gesund vs. Magen-/Pancreas-/ Darm-Karzinom .....                         | 45 |
| Tabelle 15: Konzentration verschiedener Klonkombinationen im Plasma: Gesund vs. Magen-/Pancreas-/ Darm-Karzinom .....                        | 50 |

## 1 Einleitung

Die gastrointestinalen (GI) Tumorerkrankungen gehören zu den häufigsten Malignomen in Deutschland. GI Tumorarten sind eine Gruppe von Entitäten, die das Verdauungssystem und seine Hilfsorgane betreffen (Bray, et al., 2018).

Allein am kolorektalen Karzinom erkranken mehr als sechs Prozent aller Deutschen im Laufe ihres Lebens, was somit für beide Geschlechter die zweithäufigste Tumorerkrankung darstellt. Magenkarzinom, Ösophaguskarzinom und Pankreaskarzinom gehören ebenfalls zu den quantitativ bedeutsamen Tumoren.

Während für die drei zuletzt genannten Entitäten mit Ausnahme von familiär gehäuften Erkrankungen keine Vorsorgestrategien bestehen, sind wegen der quantitativen Bedeutung für das kolorektale Karzinom seit 2002 entsprechende Vorsorgeuntersuchungen etabliert worden. Die rechtzeitige Detektion von GI-Tumoren kann das Sterberisiko erheblich reduzieren, allerdings stehen bislang nur wenige nicht-invasive Vorsorgemethoden zur Verfügung. In der "S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom" vom November 2017 wird der kompletten qualitätsgesicherten Koloskopie nach wie vor höchste Sensitivität und Spezifität für das Auffinden von Karzinomen und Adenomen zugeschrieben. Die Endoskopie gilt daher als Standardverfahren für die Kolorektalkarzinom (KRK) Vorsorge beziehungsweise Früherkennung.

Alternativ bzw. ergänzend können beim KRK Screeningmarker zum Einsatz kommen. Da die Sensitivität und Spezifität in Deutschland verfügbarer Fäkalen occulten Bluttest (FOBT) gering ist, kann der Einsatz nur eingeschränkt empfohlen werden. Auch die Einführung der immunologischen Stuhltests auf okkultes Blut hat lediglich die Spezifität etwas verbessert. Für die übrigen Tumorentitäten stehen keine Labor-Screeningmarker zur Verfügung.

Es ist bekannt, dass Tumoren über spezifische Stoffwechseleigenschaften verfügen, das sogenannte "Tumormetabolom". Die hiesigen Forschungsgruppen um Prof. E. Eigenbrodt und die Professoren Klör und Hardt haben bereits in den frühen 2000er Jahren wichtige Beiträge zu diesem Thema geleistet. Diese führten zur Etablierung des heute noch kommerziell erhältlichen Tumor M2-PK Tests für kolorektale Karzinome welcher eine Spezifität von 82% und eine Sensitivität von 79% aufweist (Hardt PD., Schlierbach P, 2004).

Durch die Entwicklung eines kostengünstigen und nicht-invasiven Tests mit gleichzeitig hoher Sensitivität und Spezifität ist die Bestimmung der Tumor M2-Pyruvatkinase ein bedeutendes Diagnostikum in der Krebsfrüherkennung geworden.

Bereits im Rahmen früherer Forschungen wurden einige Untersuchungen angestellt, mit verschiedenen Antikörperkonstellationen gegebenenfalls weitere vielversprechende Marker entwickeln zu können (PD Hardt, M Toepler et al 2003).

Diese damals unterbrochene Aktivität wurde mit Unterstützung der Firma ScheBo Biotech nun systematisch bei verschiedenen GI-Tumoren wiederaufgenommen.

Ziel dieser Arbeit ist es, basierend auf Forschungen von Prof. Eigenbroth und mittels ELISA, weitere monoklonale Antikörper-Kombinationen der Pyrovatkinase zu testen, welche der Detektion anderer gastrointestinaler Tumoridentitäten dienen könnten.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Geschichte des Tumormarker M2-PK

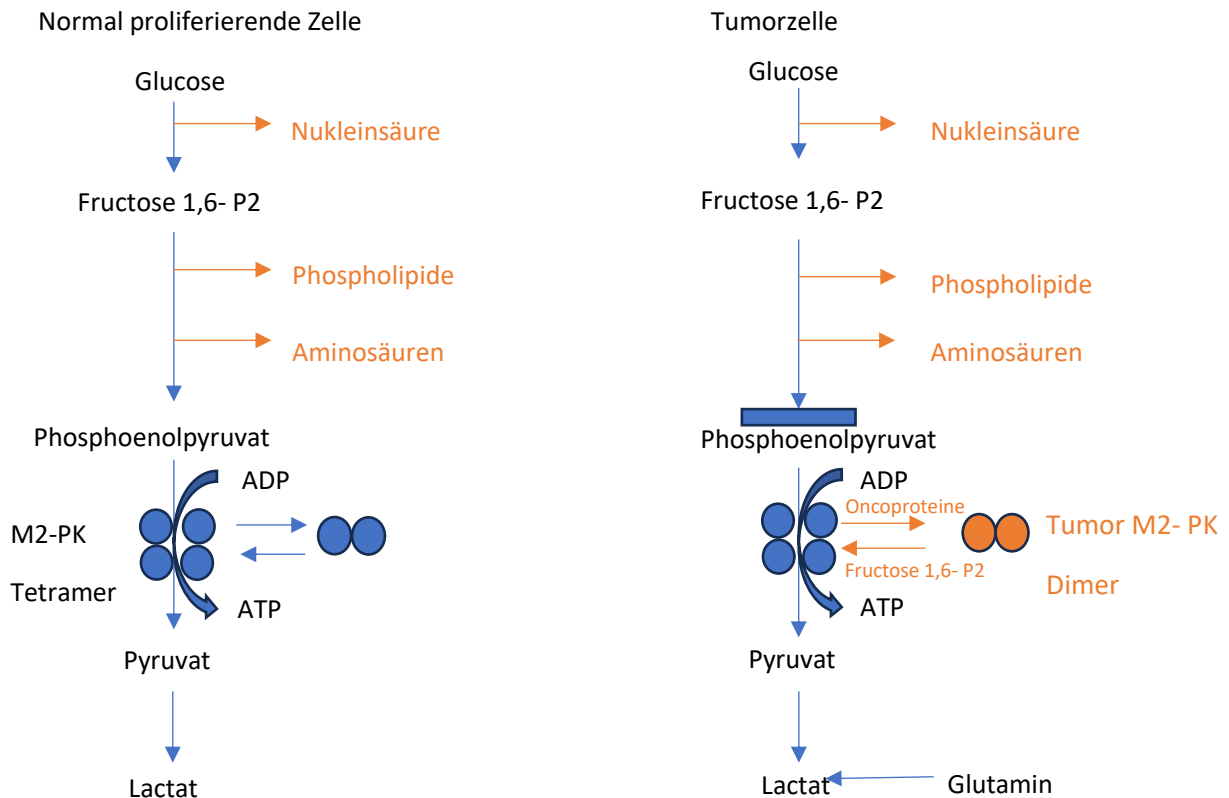
Vor fast genau hundert Jahren beschrieb Otto Warburg zum ersten Mal, dass alle Tumorzellen im Zuckerstoffwechsel eine gleichartige Veränderung gegenüber Normalzellen aufweisen (Warburg-Effekt 1924). Einer dieser Tumor-spezifischen Stoffwechsel-Merkmale ist die vermehrte Umsetzung von Glucose zu Laktat in Gegenwart von Sauerstoff. Dabei kommt es unabhängig von der Stoffwechsellage des Ursprungsgewebes, aus dem der Tumor hervorgegangen ist, immer zur Ausprägung des gleichen Phänotyps (Manfred Reinacher 1989).

Diesen Tumor-spezifischen Stoffwechsel-Phänotyp bezeichnete die biochemische Arbeitsgruppe um Prof. Eigenbrodt und Priv.-Doz. Sybille Mazurek als Tumor-Metabolom. (Mazurek und Eigenbrodt 2003)

Besonders von Bedeutung ist in diesem Zusammenhang das letzte der Kontrollenzyme der Glykolyse; die Pyruvatkinase. In Abhängigkeit ihres Ursprungsgewebes werden verschiedene Pyruvatkinase- Enzyme, sogenannte Isoenzyme exprimiert.

Isoenzyme katalysieren die gleiche Stoffwechselreaktion wie die entsprechenden Enzyme. Sie unterscheiden sich aber in ihrer Proteinstruktur, sowie in ihren physikalischen und kinetischen Eigenschaften und sie werden unterschiedlich reguliert (Hardt et al. 2004). Während der Tumorentstehung werden gewebespezifische Pyruvatkinase-Isoenzyme zunehmend weniger exprimiert. Das Isoenzym Typ M2 (M2-PK), welches sich physiologisch in allen proliferierenden Zellen findet, wird jedoch überexprimiert (Mazurek und Eigenbrodt 2003). M2-PK kommt im Organismus in zwei Formen vor: Es kann in einer tetrameren Form vorkommen, bestehend aus vier gleichen Untereinheiten und in einer dimeren Form, welche aus zwei Untereinheiten besteht. Hierbei ist die tetramere Form des M2-PK hochaktiv; wohingegen die dimere Form unter physiologischen Bedingungen nahezu inaktiv ist. In Tumorzellen überwiegt die inaktive dimere Form der Pyruvatkinase. Daher wird sie als Tumor M2-PK bezeichnet.

Die folgende Abbildung zeigt die Stoffwechselfvorgänge, die zur Bildung der Tumor M2-PK führen.



**Abbildung 1: Tetramere und dimere Form der M2-PK bei der Verstoffwechslung von Glukose in Tumorzellen (eigene Abbildung in Anlehnung an (Mazurek S. , 2010, S. 202)**

Die Tumor M2-PK wird in Blut und Stuhl abgegeben und bietet somit einen Ansatzpunkt zur frühzeitigen Erkennung von Tumoren, zur Prognose von therapeutischen Ansätzen, sowie zur Entwicklung neuer Therapiekonzepte (Hardt et al. 2004).

Für das Kolorektalkarzinom (KRK) steht bereits seit einigen Jahren ein Antikörper-basierter M2-PK Stuhltest zur Verfügung. Die Quantifizierung des Proteins in den Proben erfolgt über einen so genannten Sandwich ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) der Firma ScheBo Biotech AG. Mittels einer spezifischen Kombination aus zwei monoklonalen Antikörpern kann die Menge an M2-PK im Stuhl quantifiziert werden.

Aufgrund der bei nicht invasiven Verfahren höheren Teilnahmebereitschaft in der Bevölkerung, stellt der einfach durchzuführende M2-PK Stuhltest in Kombination mit der

invasiven koloskopischen Abklärung eines positiven Befundes ein probates Mittel zur Verbesserung der Früherkennung kolorektaler Karzinome dar.

Alternativ beziehungsweise ergänzend können beim KRK weitere Screeningmarker zum Einsatz kommen. Da die Sensitivität und Spezifität in Deutschland verfügbarer fäkaler occulter Bluttests (FOBT) gering ist, kann der Einsatz nur eingeschränkt empfohlen werden. Auch die Einführung der immunologischen Stuhltests auf okkultes Blut hat lediglich die Spezifität etwas verbessert (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V. (AWMF), Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe. 2019).

Aktuelle Studien, in denen der Nachweis der Tumor M2-PK im Stuhl als Stoffwechsel-Biomarker zur Früherkennung von kolorektalen Tumoren getestet wurde, ergaben für die Tumor M2-PK Sensitivitäten von 75% und eine Spezifität von 100% (Dabbous et al. 2019).

Die Relevanz der Etablierung neuer Vorsorgekonzepte wird bei Betrachtung, der in Deutschland erfassten Mortalitätsraten gastrointestinaler Tumorerkrankungen, verdeutlicht. Hierunter versteht man im Allgemeinen bösartige Neubildungen der am Verdauungsprozess beteiligten Organe (Gemeinsamer Bundesausschuss Berlin, 2014). Bedingt durch ihre hohe Inzidenzrate sind hierbei die Karzinome des Ösophagus, des Magens, des Pankreas und des Darms von besonderer Relevanz. Auf sie allein entfällt ein Anteil von rund 21% aller erfassten Tumorarten in Deutschland (Robert- Koch- Institut).

Während für die drei zuletzt genannten Entitäten, mit Ausnahme von familiär gehäuften Erkrankungen, keine Vorsorgestrategien bestehen, sind wegen der quantitativen Bedeutung für das kolorektale Karzinom seit 2002 entsprechende Vorsorgeuntersuchungen etabliert worden.

Für die übrigen Tumorentitäten stehen derzeit keine Labor-Screeningmarker zur Verfügung.

## 2.2 Das Tumor-Metabolom

Das wichtigste Kennzeichen der Krebszelle ist die metabolische Reprogrammierung. Tumorzellen unterscheiden sich von gesunden Zellen in der Hinsicht, dass sie zur Energiegewinnung auf aerobe Glykolyse angewiesen sind. Dies gilt auch, wenn ausreichend Sauerstoff in der Umgebung vorhanden ist (Christofk, Vander Heiden, Wu, Asara, & Cantley, 2008). Die Krebszelle produziert zusätzliche Energie, indem sie die Reaktionsrate der Glykolyse mit der Produktion von Laktat im Cytosol erhöht (Wong, De Melo, & Tang, 2013).

### 2.2.1 Gewebespezifische Isomere der Pyruvat-Kinase

In gesunden Zellen wird Pyruvat in Anwesenheit von Sauerstoff durch die mitochondriale Atmungskette entweder vollständig zu CO<sub>2</sub> unter vermehrter Produktion von Adenosintriphosphat (ATP) oxidiert oder unter sauerstoffarmen Bedingungen zu Laktat umgewandelt. Die Pyruvatkinase katalysiert die abschließende Reaktion der Glykolyse, bei der die energiereiche Phosphatgruppe von Phosphoenolpyruvat (PEP) auf Adenosindiphosphat (ADP) übertragen wird, um unter Bildung von ATP, Pyruvat zu bilden (Mazurek, 2011).

Bei Säugetieren gibt es vier Arten von gewebespezifischen Isomeren der Pyruvat-Kinase: M1-PK, M2-PK, PKL und PKR (s. Tab. 1).

**Tabelle 1: Arten der Pyruvat-Kinase und ihr Vorkommen (eigene Darstellung in Anlehnung an (Zahra, Dey, Ashish, Mishra, & Pandey, 2020))**

| gewebespezifisches Isomer der Pyruvat-Kinase | Vorkommen         |
|--|-------------------|
| <b>PKL</b>                                   | Leber             |
|  | Darm              |
|  | Pankreas          |
|  | Niere             |
| <b>PKR</b>                                   | Erythrozyten      |
| <b>M1-PK</b>                                 | Herz              |
|  | Skelettmuskel     |
|  | glatte Muskulatur |

|              |                                 |
|--------------|---------------------------------|
|              | Gehirn                          |
|              | Nebennierenmark                 |
|              | reife Spermien                  |
| <b>M2-PK</b> | Tumorzellen                     |
|              | Embryonalgewebe                 |
|              | Hoden                           |
|              | Eierstöcke                      |
|              | Nebennierenrinde                |
|              | Inselzellen (Pankreas)          |
|              | Thymus                          |
|              | distale Tubuluszellen der Niere |
|              | Leukozyten                      |

PKR wird vorwiegend in roten Blutkörperchen exprimiert, während PKL ausschließlich in Leber, Niere und Darm exprimiert wird und die geringste Neigung zur PEP aufweist (Mazurek, 2011). M1-PK wird in den Geweben hochreguliert, die einen hohen Energiebedarf haben, wie Herz, Gehirn und Muskeln. M2-PK wird in allen proliferierenden Zellen, insbesondere in Tumor- und embryonalen Geweben, exprimiert (Israelsen, et al., 2013).

M1-PK und M2-PK werden von einem einzigen PKM-Gen durch alternatives Spleißen eines primären mRNA-Transkripts abgeleitet, das Exon 9 beziehungsweise Exon 10 enthält (Luan, et al., 2015). M2-PK wird ausschließlich von den embryonalen Zellen exprimiert und im Laufe der Embryogenese wird M2-PK durch gewebespezifisches M1-PK, PKL oder PKR ersetzt.

### 2.2.2 M2-PK-Expression in Tumorzellen

In Tumorzellen ist die M2-PK-Expression hochreguliert, während die Expression der gewebespezifischen M1-PK, PKL und PKR allmählich abnimmt (Mazurek, 2011). M1-PK und M2-PK haben unterschiedliche enzymatische Eigenschaften. Sie werden durch verschiedene Faktoren auf unterschiedlichen transkriptionellen und posttranskriptionellen Ebenen reguliert. M1-PK ist ein konstitutiv aktives Enzym, das eine erhöhte Affinität zu seinem Substrat PEP aufweist. Dahingegen unterliegt die Enzymaktivität von M2-PK einer

komplexen allosterischen Regulation, die für die Tumorprogression und das Wachstum entscheidend ist (Wong, De Melo, & Tang, 2013).

M2-PK wird als Reaktion auf eine Wachstumsstimulation vom eher Pyruvatkinase-aktiven Tetramer in eine Pyruvatkinase-inaktive Dimerform umgewandelt (Gao, et al., 2013). Es wird vermutet, dass die inaktive dimere M2-PK tatsächlich einen metabolischen Vorteil für die Bereitstellung von Vorläufern für die Biosynthese bietet (Ferguson & Rathmell, 2008).

Das Dilemma ist, dass es nicht ausreicht, den Bedarf an Energie und Biosynthese-Intermediaten für das schnelle Tumorwachstum allein durch die Einstellung der Glykolyse zu decken. Tumorzellen aktivieren häufig die Glutaminolyse. Das ist ein Stoffwechselweg, der Glutamin als eine weitere, reichlich vorhandene Nahrungsquelle, nutzt (Yang, Venneti, & Nagrath, 2017).

Mittlerweile ist es gut dokumentiert, dass die Glutaminolyse in Krebszellen vieler Entitäten hochreguliert ist (Yang, Venneti, & Nagrath, 2017). Der Metabolismus von Glutamin stellt nicht nur das Kohlenstoffgerüst für die Biosynthese und die Zwischenprodukte des Zitronensäurezyklus (TCA-Zyklus) bereit, sondern liefert auch ein Reduktionspotenzial, indem es direkt in Glutathion (GSH) umgewandelt wird, welches das am häufigsten vorkommende Antioxidans in Säugetierzellen beim Umgang mit oxidativem Stress ist (Gorrini, Harris, & Mak, 2013). Dabei ist der genaue Mechanismus, wie Tumorzellen die Aktivitäten von Glykolyse und Glutaminolyse koordinieren, um ihre Wachstumsbedürfnisse zu erfüllen, bisher ungeklärt (Gorrini, Harris, & Mak, 2013).

Somit nimmt M2-PK eine Doppelrolle bei der Regulierung der Glykolyse und der Glutaminolyse ein. Neben der Bereitstellung von Kohlenstoff für den TCA-Zyklus als biosynthetische Basis und alternativen Ressourcen für NADPH und Lipide liefert Glutamat, das unmittelbare Produkt von Glutamin in der Glutaminolyse, Reduktionspotenzial durch direkte Umwandlung in GSH (Gorrini, Harris, & Mak, 2013).

Die folgende Abbildung zeigt den Stoffwechselweg, der durch M2-PK in Krebszellen reguliert wird.

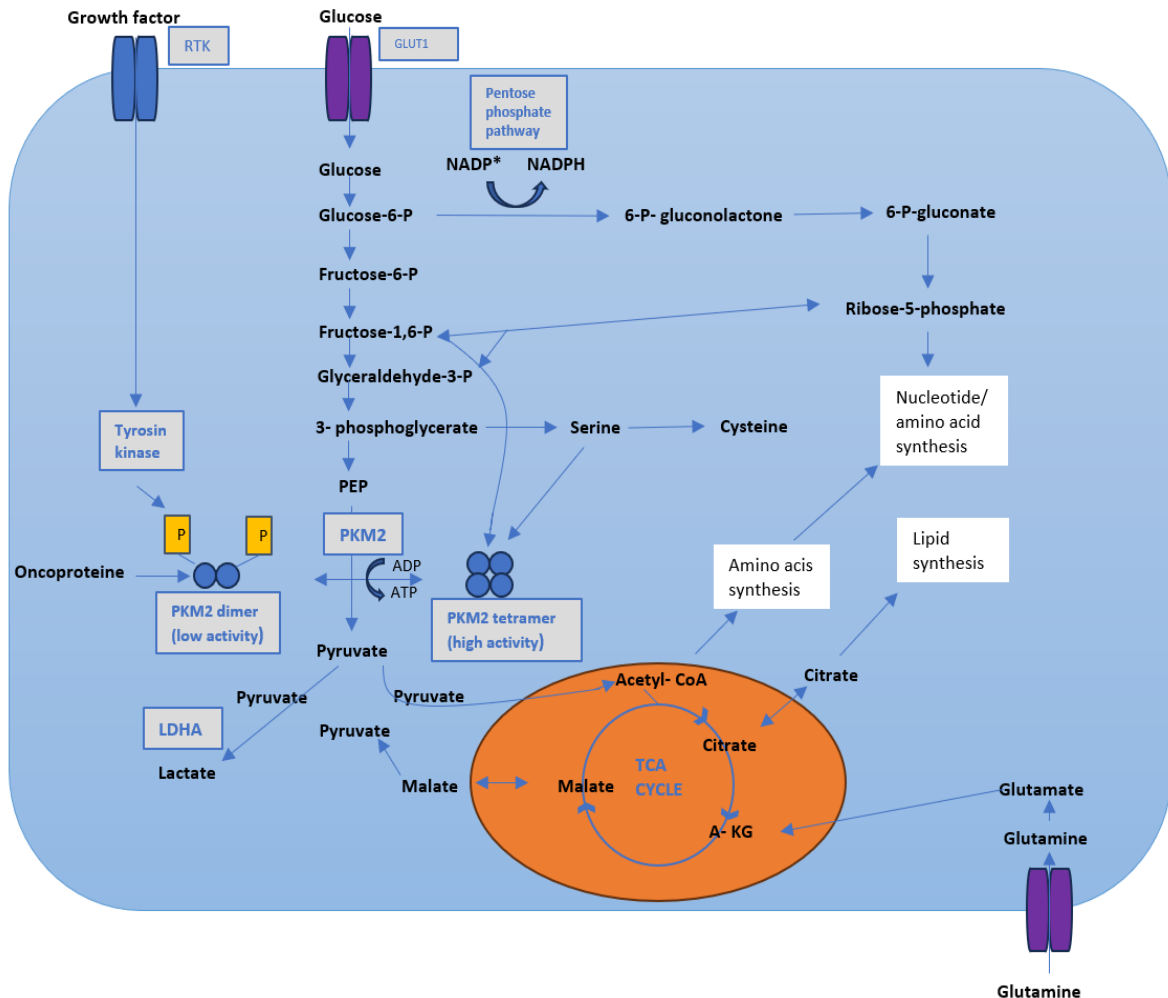


Abbildung 2: Regulation des Stoffwechsels in Tumorzellen durch M2-PK (eigene Abbildung in Anlehnung an (Tamada, Suematsu, & Saya, 2012, S. o.S.)

Die meisten Moleküle, mit denen M2-PK interagiert, beeinflussen die glykolytischen Funktionen von M2-PK, die direkt den Warburg-Effekt regulieren. Allerdings hat M2-PK auch nicht-glykolytischen Funktionen. Hier ist insbesondere die Rolle von M2-PK im Zellkern bei der Transkription zu nennen. Luo et al. (2011) zeigten, dass M2-PK direkt mit der HIF-1 Untereinheit (hypoxia-inducible factor 1) interagiert und die Transaktivierung von HIF-1 Zielgenen fördert (Luo, et al., 2011). Da HIF-1 auch die Transkription der Gene aktiviert, die für M2-PK kodieren, besteht in Krebszellen möglicherweise eine positive Rückkopplungsschleife zwischen M2-PK und HIF-1, die zu dem charakteristischen Stoffwechsel in Krebszellen beiträgt.

Die folgende Grafik veranschaulicht die nicht-glykolytische Funktionen von M2-PK im Nukleus; hier PKM2 bezeichnet.

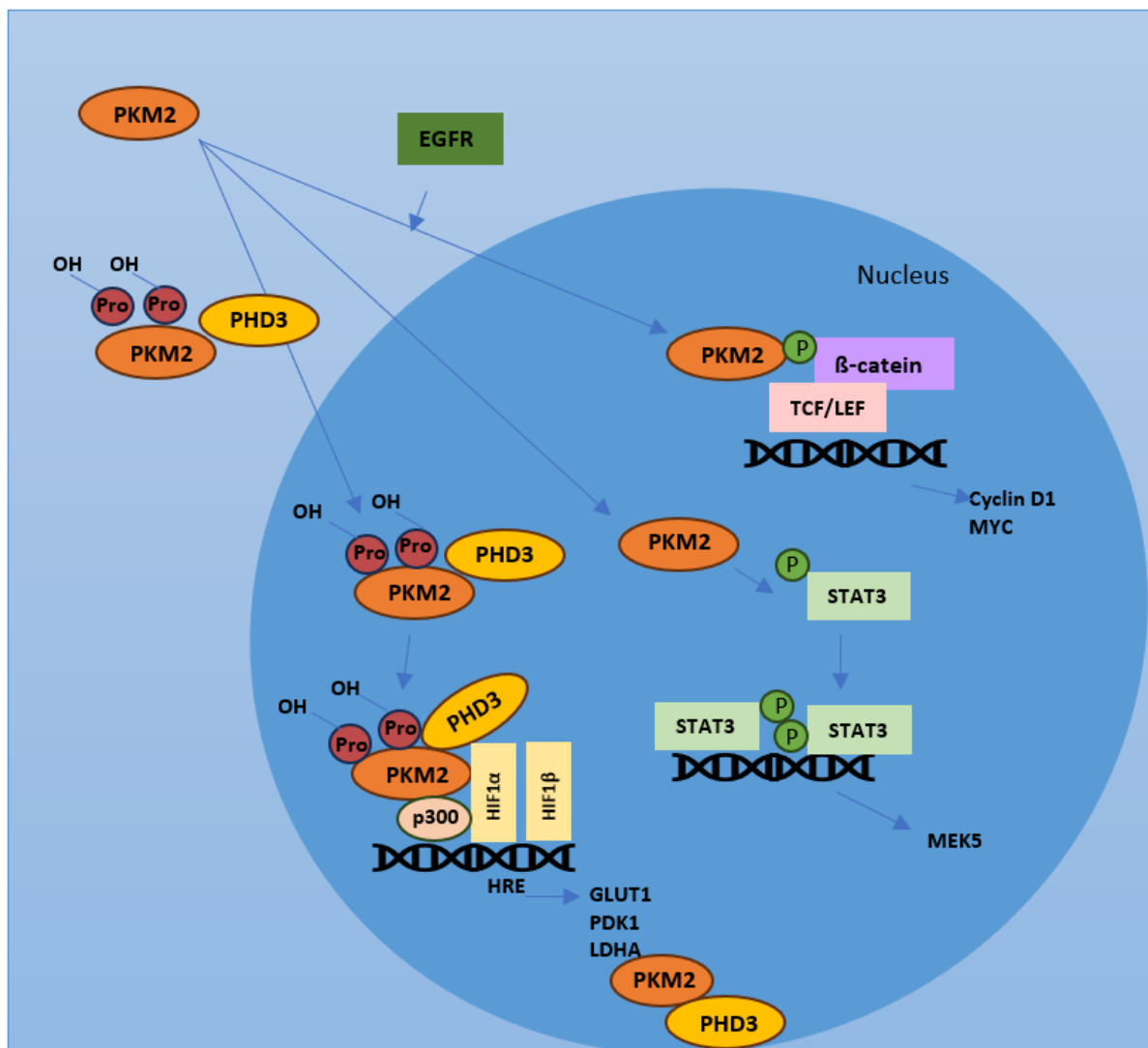


Abbildung 3: Nicht-glykolytische Funktionen von M2-PK (PKM2) im Nukleus (eigene Abbildung in Anlehnung an (Tamada, Suematsu, & Saya, 2012, S. o.S.)

PHD3-abhängige prolylhydroxylierte M2-PK interagiert mit HIF-1 und p300 und verstärkt HIF-1, um HRE der Zielgene zu besetzen. Nukleäre-M2-PK fungiert als aktive Proteinkinase, die STAT3 phosphorylieren kann. Phosphoryliertes STAT3 aktiviert die Mek5-Transkription durch Erhöhung seiner DNA-Bindungsfähigkeit. EGFR-Aktivierung induziert die Translokation von M2-PK in den Nukleus. Der M2-PK-β-Catenin-Komplex fördert zusammen mit TCF/LEF die Expression von Cyclin D1 und c-MYC. HRE, Hypoxie-Reaktions-Element; PDK1, Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase 1; PHD, Prolyl-Hydroxylase-Domäne (Tamada, Suematsu, & Saya, 2012).

M2-PK scheint Tumorzellen in zweierlei Hinsicht große Vorteile zu bieten. Die erste ist, dass das dimere M2-PK im Zytoplasma als PK fungiert, bei dem die enzymatische Aktivität gering ist, um den glykolytischen Phänotyp aufrechtzuerhalten und glykolytische Zwischenprodukte zu einem kollateralen Weg für die Biosynthese zu fördern. Die zweite ist, dass das dimere M2-PK, das in den Zellkern transloziert wird, als aktive Proteinkinase fungiert, um spezifische Kernproteine zu phosphorylieren. Zudem scheint M2-PK Einfluss auf immunologischen Reaktionen, genomische Instabilität, Angiogenese und die Pathogenese diverser Erkrankungen zu nehmen (Gupta & Bamezai, 2010).

### **2.2.3 M2-PK in Tumorgeweben als diagnostisches Tool**

Die immunhistochemische Färbung verschiedener Tumore hat das Vorhandensein von M2-PK in den Tumorgeweben gezeigt. Die Sichtbarmachung von M2-PK in Primärtumoren zeigte eine heterogene Verteilung mit unterschiedlichen Konzentrationen (Brinck, Fischer, Eigenbrodt, Oehmke, & Mazurek, 1994).

Die Expression von M2-PK wurde in zwei verschiedenen Stämmen von hepatozellulären Karzinom-Zelllinien mittels 2D-Gelelektrophorese und anschließender MALDI-TOF-Massenspektrometrie als erhöht nachgewiesen (Ding, et al., 2004). Immunhistologische Färbungen des Blutes von Patienten mit Kolonkarzinom und gastrointestinalen Tumoren, Pankreas-, Lungen-, Ovarial- und Nierenzellkarzinomen (RCC) zeigten, dass M2-PK in den Blutkreislauf freigesetzt wird (Zahra, Dey, Ashish, Mishra, & Pandey, 2020). Diverse Studien konnten zudem nachweisen, dass die Expression von M2-PK bei Patienten mit kolorektalem Karzinom (CRC) und entzündlichen Darmerkrankungen, sowie intrahepatischem Cholangiokarzinom (ICC) mit hoher Tumorzellnekrose, hoher Angiogenese und fortgeschrittenen Stadien hochreguliert ist. Daher diente M2-PK bisher als prognostischer Marker für die Früherkennung von HCC (hepatozelluläres Karzinom) und ICC (Chung-Faye, et al., 2007).

M2-PK kann auch als vielversprechender Biomarker für die Chemosensitivität bei Patienten mit fortgeschrittenem nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC) dienen, die eine Front-Line-Chemotherapie auf Platinbasis erhalten (Papadaki, et al., 2014).

Zudem ist eine erhöhte Expression von M2-PK mit den schlechtesten Gesamtüberlebensraten assoziiert (Papadaki, et al., 2014). Diverse Studien konnten zeigen, dass M2-PK durch die Regulierung der Expression von NEK2 beim Multiplen Myelom hoch exprimiert wird, was darauf hindeutet, dass es als prognostischer Marker dienen könnte (Gu, et al., 2017). Bei

Patienten mit multiplen Myelom ist eine schlechte Prognose mit einer höheren Expression des M2-PK-Gens verbunden (Panchabhai, Schlam, Sebastian, & Fonseca, 2017).

Hohe Stoffwechselaktivität und proliferative Kapazität der Tumorzellen werden durch M2-PK widergespiegelt, so dass es als nicht-organspezifischer molekularer Marker dient (Mazurek, 2011). Zusätzlich wird ein Teil von M2-PK durch die Nekrose von Krebszellen und die Erneuerung von Tumorzellen auch in benachbarte Gewebe freigesetzt, was zur Früherkennung von Krebs genutzt werden kann. Der M2-PK-Spiegel im zirkulierenden Blut von Patienten kann als potenzieller diagnostischer Marker bei verschiedenen Karzinomen dienen (Ahmed, et al., 2007).

### **2.3 Gastrointestinale Tumorerkrankungen**

Jährlich gibt es weltweit schätzungsweise 18,1 Millionen neue Tumorerkrankungen und 9,6 Millionen tumorbedingte Todesfälle (Bray, et al., 2018). Bei beiden Geschlechtern zusammen ist das Bronchialkarzinom die am häufigsten diagnostizierte Tumorart (11,6% der Gesamtfälle) und die führende tumorbedingte Todesursache (18,4% der gesamten Tumortodesfälle), dicht gefolgt vom Mammakarzinom (11,6%), Prostatakarzinom (7,1%) und den gastrointestinalen Tumoren (6,1%). Innerhalb dieser Gruppe haben Darmkrebs (9,2%), Magenkrebs (8,2%) und Leberkrebs (8,2%) die höchste Mortalitätsrate.

Gastrointestinale (GI)Tumorarten sind eine Gruppe von Entitäten, die das Verdauungssystem und seine Hilfsorgane betreffen. Die häufigsten Tumorarten im Zusammenhang mit dem GI-Trakt sind kolorektale Karzinome, Magen- und Speiseröhrenkarzinome (Bray, et al., 2018). Jüngste Studien in Ländern mit hohem Einkommen haben gezeigt, dass ein Drittel bis zwei Fünftel der neuen Tumorfälle vermieden werden könnten, wenn die Exposition gegenüber bekannten Lebensstil- und Umweltrisikofaktoren beseitigt oder reduziert würde (Islami, Goding Sauer, & Miller, 2018).

Obwohl es mehrere Interventionen gibt, die sich als wirksames Mittel zur Tumorprävention erwiesen haben, stecken die gesundheitspolitischen Bemühungen zur Förderung und Umsetzung der Primärprävention weiterhin in den Kinderschuhen und die politischen Entscheidungsträger sind sich des Grades der Fortschritte und des Nutzens der Prävention nicht bewusst (Thun, Wild, & Colditz, 2018). Bei der Diagnosestellung gilt es zunächst einmal funktionelle von organischen Darmpathologien zu differenzieren. Dafür haben sich fäkale Entzündungsmarker als nicht-invasive Screening-Tools als nützlich erwiesen. Von diesen Markern ist Calprotectin der am intensivsten untersuchte. Eine Studie von Jeffery et al.

(2009) testete die Performance von M2-PK im Vergleich zu Calprotectin. Fäkales Calprotectin und Tumor M2-PK wurden bei 94 Kontrollen und 105 ambulanten gastroenterologischen Patienten mit einer möglichen Diagnose einer organischen Darmerkrankung gemessen. Die Diagnose wurde anhand klinischer, endoskopischer und radiologischer Kriterien gestellt. Eine organische Darmerkrankung wurde bei 14 Patienten (13%) diagnostiziert. Die medianen Calprotectin- und Tumor-M2-PK-Konzentrationen betragen 24,5 Mikrog/g und 1 U/mL bei Kontrollen, 23 Mikrog/g und 1 U/mL bei funktionellen und 227,5 Mikrog/g und 12,6 U/mL bei organischen Darmerkrankungen. Sensitivität, Spezifität sowie positive und negative Likelihood Ratios für die Diagnose einer organischen Darmerkrankung betragen 93%, 92%, 11,6 und 0,07 für Calprotectin bzw. 67%, 88% 5,6 und 0,18 für Tumor M2-PK. Calprotectin in Kombination mit Tumor-M2-PK ergab eine Sensitivität von 64%, eine Spezifität von 98% und Likelihood Ratios von 32 und 0,03. Erhöhtes Calprotectin oder Tumor-M2-PK verringerte die Spezifität auf 87%, erhöhte aber die Sensitivität auf 100%.

Damit konnte dokumentiert werden, dass der Tumor M2-PK-Test in der Lage ist, organische von funktionellen Darmerkrankungen zu unterscheiden. Allerdings hatte er eine geringere Sensitivität, Spezifität und einen niedrigeren prädiktiven Wert als Calprotectin (Jeffery, Lewis, & Ayling, 2009).

### 2.3.1 Das Magenkarzinom

Magenkarzinome sind weltweit die fünfthäufigste Krebserkrankung und verantwortlich für mehr als 1.000.000 Neuerkrankungen im Jahr 2018 und schätzungsweise 783.000 Todesfälle (das entspricht 1/12 Todesfällen weltweit). Die Raten sind bei Männern doppelt so hoch wie bei Frauen. Unter Männern ist es die am häufigsten diagnostizierte Krebserkrankung und die häufigste Krebstodesursache in mehreren westasiatischen Ländern. Die Inzidenzraten sind in Ostasien deutlich erhöht; während die Raten in Nordamerika und Nordeuropa im Allgemeinen deutlich niedriger sind (Bray, et al., 2018).

*Helicobacter pylori* ist der Hauptrisikofaktor für Magenkrebs, wobei fast 90% der neuen Fälle von nicht-kardialen Magenkrebs diesem Bakterium zugeschrieben werden (Plummer, Franceschi, Vignat, Forman, & de Martel, 2015). Obwohl die internationalen Unterschiede in der *H. pylori*-Prävalenz weitgehend mit denen der Magenkrebsinzidenz korrelieren, sind wahrscheinlich auch andere Faktoren neben dem Bakterium von Bedeutung. Es gibt eine Ernährungskomponente, bei der durch Pökeln konservierte Lebensmittel und ein geringer Obstverzehr das Risiko erhöhen; Alkoholkonsum und aktives Tabakrauchen sind ebenfalls etablierte Risikofaktoren (IARC, 2012).

Magenkarzinome können in zwei topographische Kategorien eingeteilt werden. Die Raten von nicht-kardialen Magenkarzinomen (aus distaleren Regionen stammend) sind im letzten halben Jahrhundert in den meisten Populationen stetig zurückgegangen. Diese Trends werden dem ungeplanten Siegeszug der Prävention zugeschrieben, einschließlich einer geringeren Prävalenz von *H. pylori* und Verbesserungen bei der Konservierung und Lagerung von Lebensmitteln (Howson, Hiyama, & Wynder, 1986).

Tumoren der Kardia im Bereich des Übergangs zwischen Speiseröhre und Magen, weisen epidemiologische Merkmale auf, die denen des Adenokarzinoms der Speiseröhre ähnlich sind. Zu den wichtigen Risikofaktoren gehören Fettleibigkeit und die gastroösophageale Refluxkrankheit (GERD). Es wird angenommen, dass auch der Barrett-Ösophagus (eine Erkrankung, die aus GERD resultiert) das Risiko erhöht. Die Inzidenz dieser Tumorentitäten hat insbesondere in Ländern mit hohem Einkommen zugenommen (deMartel & Parsonnet, 2018).

Hardt et al. (2003) verwendeten ein ELISA auf Basis einer zusätzlichen Antikörperkombination, um den Stuhl von Patienten mit GI-Tumoren zu untersuchen. Hierfür wurde der konventionelle ELISA der Firma ScheBoBiotech AG, Gießen, Deutschland, der auf einem für Tumor M2-PK spezifischen Antikörper basiert, mit einem weiteren Antikörper,

der mit Tumor M2-PK, M1-PK und dem tetrameren M2-PK reagiert, kombiniert. Untersucht wurden Stuhlproben von gesunden Kontrollen, Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen (IBD) und verschiedenen Arten von GI-Tumoren. Im Vergleich zu den Kontrollen zeigten die Proben von IBD oder verschiedenen Tumoren keine signifikanten Unterschiede. Allerdings wiesen Patienten mit Magenkrebs eine signifikante Erhöhung der fäkalen PK in 80% der Fälle auf ( $p = 0,005$ ). Damit erwies sich der Kombinationstest für ein spezielles Screening auf Magentumoren als geeignet (Hardt, Toepler, Ngoumou, Rupp, & Kloer, 2003).

### **2.3.2 Das Pankreas-Karzinom**

Maligne Neoplasien der Bauchspeicheldrüse verursachen in den frühen Stadien oft keine oder nur unspezifische Symptome, sodass der Tumor häufig erst spät erkannt wird. (Robert- Koch-Institut November 2017). Entsprechend ist die relative 5-Jahres-Überlebensrate beim Pankreaskarzinom mit 8% bei Männern und 7% bei Frauen die niedrigste Überlebensrate unter allen Krebserkrankungen in Deutschland (Robert- Koch- Institut November 2017). Ursächlich dafür sind unter anderem die späte Diagnosestellung, die daraus folgende geringe kurative Resektionsrate und die frühe und aggressive Metastasierung. Pankreaskarzinome (PC) entstehen, wenn sich Zellen der Bauchspeicheldrüse abnormal vermehren. Sie sind gekennzeichnet durch gelbe Haut, Gewichtsverlust, Rücken- oder Bauchschmerzen, dunklen Urin, hellen Stuhl und Appetitlosigkeit (Hidalgo, 2010). Die frühen Symptome der PC sind nicht augenfällig, so dass neu diagnostizierte PC-Fälle meist bereits ein fortgeschrittenes Stadium erreicht haben (Yadav & Lowenfels, 2013). PC wird vor allem durch Tabakrauchen, Diabetes, Adipositas und genetische Prädispositionen ausgelöst (Ryan, Hong, & Bardeesy, 2014).

Weltweit ist PC die siebthäufigste Ursache für tumorassoziierte Mortalität. Die Prognose des PC ist in der Regel sehr schlecht. Etwa 95% der Betroffenen versterben innerhalb von fünf Jahren und 25% überleben nur ein Jahr nach der Diagnose. Das Adenokarzinom des Pankreas ist die häufigste Form des PC und macht 85% aller PC-Fälle aus (Ryan, Hong, & Bardeesy, 2014). Fast alle Fälle von Pankreas-Adenokarzinomen gehen von den Gängen der Bauchspeicheldrüse aus und werden als pankreatisch-duktales Adenokarzinom (PDAC) bezeichnet (Dunne & Hezel, 2015).

Für Pankreaskarzinome stehen verschiedene Tumormarker im Blut zur Verfügung. PDACs bilden primär den Marker „cancer antigen 19-9“ (CA 19-9). Daneben gibt es auch CA 50, CA 72-4, CA 195 und CA 242 und das „carcinoembryonales Antigen“ (CEA). Allerdings ist es anhand des Bluttests nicht möglich, maligne Neoplasien von chronischen Prozessen wie beispielsweise einer chronischen Pankreatitis zu differenzieren (Hohenberger, 2017).

Ince et al. (2014) untersuchten die Eignung der Marker: CEA, CA 19-9, vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor-3 (VEGFR-3) und TAC-Test (antioxidative Kapazität) für die Differentialdiagnose. Bei den Patienten (n = 225) waren der Pankreaskopfkrebs (18,2%), das Cholangiokarzinom (11,4%) und Choledochussteine (48%) die häufigsten Ätiologien. Serum-TAC hatte eine höhere Sensitivität (61,1%) und CEA eine niedrigere Sensitivität (42,7%); während CEA eine höhere Spezifität (89,9%) und TAC eine niedrigere Spezifität (60,5%) hatte. Bei den Gallengangstumormarkern hatte CA 19-9 eine höhere Sensitivität (74%) und VEGFR-3 eine niedrigere Sensitivität (56,2%); allerdings hatte VEGFR-3 eine höhere Spezifität (79,1%) und CA 19-9 eine niedrigere Spezifität (34,1%). Zusätzlich erreichte die Kombination der Marker Serum-CEA ( $p < 0,001$ ), CA 19-9 ( $p < 0,001$ ), VEGFR-3 ( $p < 0,001$ ) und biliäres CA 19-9 ( $p = 0,028$ ) eine 95%ige Schätzwahrscheinlichkeit, und die Sensitivität, Spezifität und Genauigkeit lagen bei 88,5%, 45,7% bzw. 64%. Aus den Resultaten schlussfolgerten die Autoren, dass Serum- und biliäre CEA-, CA 19-9-, VEGFR-3- und TAC-Tests bei der Differenzierung zwischen malignen und benignen Gallengangsobstruktionen nicht nützlich seien (Ince, et al., 2014).

Yamazaki et al. (2014) zeigten, dass das SMAD3 zum malignen Potenzial des PDAC beiträgt, indem es die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) in den Tumorzellen induziert und somit einen vielversprechenden Biomarker für eine schlechte Prognose darstellt (Yamazaki, et al., 2014). Masugi et al. (2015) stellten fest, dass Integrin  $\beta 4$  bei der Regulierung von EMT und Tumorinvasion eine Rolle spielt und seine Überexpression eine klinisch-pathologische und prognostische Bedeutung beim PDAC hat (Masugi, et al., 2015). Xia et al. (2015) berichteten, dass die geschlechtsbestimmende Region Y-Box 9 (SOX9) und phosphorylierte-v-Akt murine thymoma viral oncogene homolog 1 (p-AKT) mit Proliferation und Fernmetastasierung assoziiert sind. Das deutet darauf hin, dass SOX9 und p-AKT möglicherweise die Prognose von PDAC vorhersagen können (Xia, et al., 2015). Die Downregulation des anterioren Gradienten 2 wird durch EMT induziert und dient als prognostischer Marker bei Patienten mit PDAC (Mizuuchi, et al., 2014).

Eine aktuellere Studie von Bandara et al. (2018) untersuchte die potentielle Rolle der präoperativen Tumor M2-PK nicht als Screening-tool, sondern als Prognosemarker bei Patienten mit Pankreasmalignität. 73 konsekutive Patienten mit der klinischen Diagnose eines Pankreas- oder peri-ampullären Karzinoms wurden in die Studie aufgenommen. Ihr Durchschnittsalter betrug 66 (23-83) Jahre. Präoperative Proben von venösem Blut wurden für die Analyse von Tumor M2-PK entnommen. Der Mittelwert von Tumor M2-PK im Plasma bei pankreatischen/periampullären Malignomen betrug 60,3 (106,5) U/ml und 22 U/ml (SD: 12 U/ml) bei einigen Erkrankungen ( $p < 0,001$ ). Die multivariate Cox-Regressionsanalyse zeigte, dass Tumor M2-PK ( $> 27$  U/ml), Ca19-9 ( $> 39$  U/ml), Resektionsstatus und Krankheitsstadium mit einem schlechteren Überleben assoziiert waren. Tumor M2-PK-Werte größer als 27 U/ml waren mit einem schlechteren Überleben im Vergleich zu denen mit niedrigeren Werten assoziiert (Hazard Ratio 2,049, signifikant erhöhtes Sterberisiko,  $p = 0,042$ ). Somit konnten die Autoren nachweisen, dass ein erhöhter Tumor M2-PK-Wert (mit einer Cutoff-Schwelle von 27 U/ml), der präoperativ gemessen wurde, mit einer schlechteren Prognose bei Patienten mit Pankreas- und periampullärem Karzinom assoziiert ist (Bandara, Baltatzis, Sanyal, & Siriwardena, 2018).

Das Problem bei der endgültigen Diagnosestellung eines Pankreas Karzinoms ist, dass einzelne bildgebende Verfahren derzeit keine exakte Diagnose zulassen. Daher ist eine Kombination verschiedener Verfahren üblich. Dazu gehören:

- Computertomographie (CT)
- Röntgen des Thorax
- Endoskopie von Magen und Duodenum
- Endoskopie von Pankreasgängen und Galle (ERCP) (röntgenologisch)
- Magnetresonanztomographie (MRT)
- Biopsie
- Laparoskopie (optional)
- Skelettszintigraphie (optional)
- Positronen-Emissions-Tomographie (PET) (optional) (Hohenberger, 2017).

### 2.3.3 Darm-Karzinome

Wie international üblich, werden die seltenen Krebsformen des Dünndarms nicht zum Darmkrebs gezählt, tumoröse Erkrankung des Dickdarms werden als kolorektales Karzinom (KRK) bezeichnet und machen mehr als 90% aller Karzinome des Darms aus. Im Jahr 2013 erkrankten in Deutschland etwa 62.400 Menschen beider Geschlechter an Darmkrebs. Etwa 40% der Betroffenen starben noch im gleichen Jahr an ihrer Erkrankung. Nach Angaben des Robert Koch Instituts ist allerdings eine seit 2003 sinkende Inzidenzrate in Deutschland in den Altersgruppen ab 55 Jahren zu verzeichnen. Es kann davon ausgegangen werden, dass aufgrund der seit 2002 bundesweit etablierten Darmspiegelung zur Früherkennung, Vorstufen von Darmkrebs erkannt und zugleich entfernt werden, was maßgeblich für die sinkenden Fallzahlen verantwortlich gemacht werden kann.

In der “S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom“ vom Januar 2019 wird der kompletten qualitätsgesicherten Koloskopie nach wie vor höchste Sensitivität und Spezifität für das Auffinden von Karzinomen und Adenomen zugeschrieben. Die Endoskopie gilt daher als Standardverfahren für die Darmkrebs Vorsorge beziehungsweise Früherkennung (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V. (AWMF), Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe. 2019).

Die Inzidenzraten für Darmkrebs variieren stark. Die Krankheit kann als Marker für die sozioökonomische Entwicklung angesehen werden. In Ländern, die sich in einem starken Entwicklungswandel befinden, steigen die Inzidenzraten tendenziell gleichmäßig mit zunehmendem Lebensstandard (Fidler, Soerjomataram, & Bray, 2016). Bei der Bewertung der Inzidenz- und Mortalitätstrends identifizierten Arnold et al. (2017) drei verschiedene globale zeitliche Muster, die mit dem Entwicklungsniveau zusammenhängen:

- 1) Anstieg sowohl der Inzidenz als auch der Mortalität im letzten Jahrzehnt (einschließlich der baltischen Länder, Russland, China und Brasilien);
- 2) steigende Inzidenz, aber sinkende Mortalität (Kanada, Großbritannien, Dänemark und Singapur) und
- 3) sowohl sinkende Inzidenz als auch sinkende Mortalität (USA, Japan und Frankreich) (Arnold, Sierra, Laversanne, & Soerjomataram, 2017).

Der Anstieg der Inzidenz insbesondere der Generationswechsel, der in den meisten Alterskohortenanalysen festgestellt wurde deutet auf den Einfluss von Ernährungsgewohnheiten, Fettleibigkeit und Lebensstilfaktoren hin; während der Rückgang der Sterblichkeit, die Verbesserung der Überlebensrate durch die Fortschritte in der

Krebsfrüherkennung und -behandlung in den entwickelten Ländern widerspiegelt (Arnold, Sierra, Laversanne, & Soerjomataram, 2017).

Obwohl die Ergebnisse von Studien, die das Darmkrebsrisiko und einzelne Lebensmittel oder Nährstoffe untersuchten, tendenziell widersprüchlich waren, stellte der überarbeitete Bericht des World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research (2018) überzeugende Beweise dafür fest, dass verarbeitetes Fleisch, alkoholische Getränke und Körperfett das Risiko erhöhen, während körperliche Aktivität schützend wirkt. Eine Ernährung mit hohem Verzehr von rotem oder verarbeitetem Fleisch wurde mit einem erhöhten Risiko für Dickdarmkrebs in Verbindung gebracht, nicht jedoch für Enddarmkrebs (Magalhaes, Peleteiro, & Lunet, 2012).

Die Untersuchungen für die Eignung des fäkalen M2-PK-Tests zum Screening kolorektaler Karzinome sind speziell im Vergleich zum FOBT widersprüchlich.

Mulder et al. (2007) kamen in ihrer Vergleichsstudie zu dem Ergebnis, dass beide Tests eine hohe Positivitätsrate bei Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen (79% für M2-PK und Immo-care und 89% für OC-Light) zeigten. Insgesamt wurden 52 Patienten mit KRK, 47 mit kolorektalen Adenomen und 63 gematchte Kontrollen mit einer konventionellen Koloskopie analysiert. 19 zusätzliche Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen wurden untersucht, um den Einfluss von Entzündungen festzustellen. Die Stuhlproben wurden mit zwei immunochemischen FOBTs, Immo-care und OC-Light und mit einem kommerziellen Enzymimmunoassay für M2-PK analysiert. Bei Patienten mit KRK lag die Sensitivität von TuM2-PK, Immo-care und OC-Light bei 85%, 92% beziehungsweise 94%. Bei Patienten mit Adenomen lag die Sensitivität jedoch nur bei 28%, 40% beziehungsweise 34%. Die Spezifität für diese Tests betrug 90% für TuM2-PK und 97% für beide immunochemischen FOBTs (Mulder, et al., 2007).

Shastri et al. (2008) verglichen eine Modifikation der FOBT, den IFOBT, mit dem M2-PK-Test. Die Diagnosen wurden gegen den Goldstandard der Koloskopie verglichen. Die Autorengruppe kam zu dem Erkenntnis, dass sich der immunologische Test auf okkultes Blut im Stuhl (IFOBT) als präziserer Marker für die Darmkrebsvorsorge etabliert hat als der traditionelle FOBT auf Guajakbasis. 46 konsekutive Probanden (sowohl symptomatisch als auch zum KRK-Screening), die aus verschiedenen Indikationen in fünf Zentren in Deutschland zur Koloskopie überwiesen wurden, stellten die Stuhlproben für die Durchführung der M2-PK und eines immunochemischen FOB-Streifentests zur Verfügung. Der verwendete IFOBT war ein immunochemischer Schnelltest zum Nachweis von fäkalem Hämoglobin. Für den M2-PK wurde ein handelsüblicher Sandwich Enzyme-Linked

Immunsorbent Assay (ELISA) verwendet. Der M2-PK-Test benötigt sechs Stunden, während der IFOBT in nur zehn Minuten abgelesen werden kann und wesentlich preisgünstiger ist. Der IFOBT zeigte eine Sensitivität, Spezifität, einen positiven prädiktiven Wert (PPV), einen negativen prädiktiven Wert (NPV) und positive und negative Likelihood Ratios (LR) von 64,5%, 96,3%, 72,0%, 94,9%, 17,5% und 0,4 für die Diagnose kolorektaler Neoplasien (KRN), während die oben genannten Leistungsmerkmale für M2-PK bei einem Cutoff-Wert von 4 U/mL 72,4%, 73,8%, 29,0%, 94,8%, 2,8% und 0,8 betragen. Damit wies der IFOBT eine signifikant höhere Spezifität, PPV und positive LR im Vergleich zur M2-PK auf. Der IFOBT erwies sich als klinisch leicht anwendbares, schnelles und kostengünstiges Screening-tool bei Patienten mit überdurchschnittlichem Risiko zur Erkennung von KRN (Shastri, et al., 2008).

Tonus et al. (2012) führten eine Meta-Analyse durch, um die Wirksamkeit des fäkalen Pyruvatkinase-Isoenzym-Typ M2 (fäkale M2-PK) Tests für das KRK-Screening darzustellen und kritisch zu diskutieren (Tonus, Sellinger, Koss, & Neupert, 2012). In 17 unabhängigen Studien wurden Stuhlproben von 704 Patienten mit KRK und von 11 412 gesunden Probanden auf fäkale M2-PK-Konzentrationen untersucht. Die mittlere fäkale M2-PK-Sensitivität lag bei 80,3%, die Spezifität bei 95,2%. Vier Studien verglichen fäkale M2-PK direkt mit dem Guajak-basierten Test auf okkultes Blut im Stuhl (gFOBT). Die fäkale M2-PK zeigte eine Sensitivität von 81,1%, während der gFOBT nur 36,9% der KRKs entdeckte. Acht unabhängige Studien untersuchten die Sensitivität der fäkalen M2-PK für Adenome (n = 554) mit folgenden Sensitivitäten: Adenom < 1 cm im Durchmesser: 25%; Adenom > 1 cm: 44%; Adenom mit nicht spezifiziertem Durchmesser: 51%. Im direkten Vergleich mit dem gFOBT von Adenomen > 1 cm Durchmesser waren 47% mit dem fäkalen M2-PK-Test positiv, während der gFOBT nur 27% erkannte. Die Autoren empfahlen daher den M2-PK als Screening-tool für die Darmvorsorgeuntersuchungen (Tonus, Sellinger, Koss, & Neupert, 2012).

### 2.3.4 Zusammenfassung

Bezüglich des Potenzials von Tumormarkern als Screening-tools sollten einige grundlegende Punkte berücksichtigt werden:

- Tumormarker sind in der Regel nicht organspezifisch (Ausnahmen: Thyreoglobulin, PSA, Calcitonin)
- Tumormarker sind in der Regel nicht tumorspezifisch (differentialdiagnostische Abgrenzung zu benignen Veränderungen und/oder Infektionen problematisch)
- Tumormarker können Störfaktoren unterliegen (etwa 5% der gesunden Personen weisen erhöhte Werte auf)
- Tumormarker können vor allem in den frühen Stadien maligner Neoplasien im Referenzbereich liegen, daher sind sie nicht zum Ausschluss dieser Entitäten geeignet (AMBOSS, 2020).

Allerdings werden sie bisher sehr erfolgreich in der Verlaufskontrolle und der Nachsorge von malignen Tumoren verwendet. Rezidive können so frühzeitig erkannt werden und deutliche Schwankungen und Erhöhungen können Aufschluss hinsichtlich der Prognose geben. Auch therapeutische Ansätze sind vielversprechend. Als Screening-tool kommen sie derzeit vorwiegend nur bei Risikogruppen und genetisch prädisponierten Personen zum Einsatz und werden oftmals mit Bildgebungen kombiniert (AMBOSS, 2020).

Bei gastrointestinalen Tumoren haben sich folgende Marker etabliert:

**Tabelle 2: Tumormarker bei gastrointestinalen Tumoren (eigene Darstellung in Anlehnung an (Herold, 2019))**

| <b>Tumormarker</b>                                   | <b>Malignome</b>   | <b>weitere Informationen</b>  |
|--|--|---|
| <b>CA 19-9</b>                                       | Pankreaskarzinom;<br>Magenkarzinom; kolorektales<br>Karzinom;<br>Gallengangskarzinom | bei Patienten mit Blutgruppe Lewis-<br>negativ ist der Test oftmals falsch<br>negativ |
| <b>CA 72-4</b>                                       | Magenkarzinom  | auch erhöht bei Pankreatitis  |
| <b>CEA</b>   | kolorektales Karzinom;<br>Pankreaskarzinom;<br>Magenkarzinom                         | auch erhöht bei Rauchern und<br>Lebererkrankungen                                     |
| <b>squamous cell<br/>carcinoma<br/>antigen (SCC)</b> | Ösophaguskarzinom  |   |
| <b>Mesothelin<br/>(MSLN)</b>                         | Pankreaskarzinom;<br>Ösophaguskarzinom;<br>Magenkarzinom                             | membranständiges Glykoprotein   |

## 2.4 Ziel der Arbeit

Bislang hat man bei Tumoren im Gastrointestinaltrakt nur wenige Möglichkeiten einer nicht invasiven Vorsorgeuntersuchung. Dabei kann die rechtzeitige Entdeckung einer Erkrankung in diesem Bereich das Sterberisiko deutlich reduzieren.

Die Durchführung der vorgesehenen klinischen Testung eröffnet möglicherweise neue Möglichkeiten, schwerwiegende Erkrankungen so früh wie möglich zu erkennen und sie gezielt behandeln zu können.

Es werden im Rahmen der Studie Blut- und Stuhlproben von Patienten mit definierten gastrointestinalen Tumorleiden, explizit Magen-, Pankreas- und Darmkarzinome, welche noch nicht therapiert wurden, gesammelt und untersucht. Anhand der gewonnenen Proben sollen neue Markerkonzepte getestet werden, um tumorspezifische Stoffwechseleigenschaften ausfindig zu machen. Es ist bereits bekannt und von der hiesigen Arbeitsgruppe auch schon erfolgreich bearbeitet worden, dass Tumoren über besondere Stoffwechseleigenschaften verfügen („Tumormetabolom“). Bereits in den frühen 2000er Jahren hatten Mitarbeiter der Veterinärmedizinischen Endokrinologie unter Leitung von Prof. E. Eigenbrodt und der gastroenterologischen Arbeitsgruppe um die Professoren Klör und Hardt einige Arbeiten zu diesem Thema veröffentlicht. Diese führten zur Etablierung des heute noch kommerziell erhältlichen Tumor M2-PK Tests, welcher mittels zwei Monoklonalen Antikörperpaaren kolorektale Karzinome gezielt detektieren kann. Bereits damals wurden einige Untersuchungen angestellt, mit verschiedenen Antikörperkonstellationen gegebenenfalls bessere Marker entwickeln zu können, so konnte auf Basis des M2-PK durch zusätzliche Antikörperkombination von Klon 1 und Klon 3 eine signifikante Erhöhung der fäkalen PK bei Patienten mit Magenkrebs festgestellt werden (PD Hardt, M Toepler et al 2003)

Diese damals unterbrochene Aktivität soll nun systematisch bei verschiedenen GI-Tumoren wieder aufgenommen werden. Die Arbeit wird von der Firma ScheBo Biotech unterstützt.

Ziel dieser Arbeit ist es, basierend auf Forschungen von Prof. Eigenbroth und mittels ELISA, weitere monoklonale Antikörper-Kombinationen der Pyrovatkinase zu testen, welche der Detektion anderer gastrointestinaler Tumoridentitäten dienen könnten.

## **3 Material und Methode**

### **3.1 Studiendesign**

Die vorliegende Arbeit stellt eine monozentrische, kontrollierte prospektive Datenanalyse dar. Durchgeführt nach Etikvotum AZ 216/18 vom 07.01.2019. Es bestanden nur sehr geringe zusätzliche Belastungen oder Risiken für die in der Studie eingeschlossenen Patienten, die sich lediglich auf eine Blutentnahme und die Abgabe einer Stuhlprobe bezogen.

Alle Daten wurden zusammengeführt, pseudonymisiert und später anonymisiert. So ist eine Rückverfolgung oder ein Bezug der Daten zu einem bestimmten Patienten für eine dritte Person nicht mehr möglich. Nur im anonymisierten Zustand wurden die Daten statistisch ausgewertet.

### **3.2 Materialgewinnung**

Die Blut- und Stuhlentnahmen erfolgten im Rahmen des stationären Aufenthaltes der Patienten. Über die Entnahme von Material zu wissenschaftlichen Zwecken und die damit verbundenen Risiken wurden sie ausführlich aufgeklärt und stimmten mittels schriftlicher Einverständniserklärung zu. Gleichzeitig wurden sie darüber informiert, dass ihre Daten anonymisiert weiter analysiert werden. Allerdings würde sich aufgrund des Studiendesigns kein direkter Nutzen für den einzelnen Teilnehmer ergeben.

### **3.3 Probenaufarbeitung und Lagerung**

Mittels zweier 7,5ml EDTA-Monovette (SMonovette® mit Kalium-EDTA, Firma Sarstedt) wurde über eine periphere Vene des Armes insgesamt 15ml Blut entnommen. Spätestens zwei Stunden nach der Entnahme wurde das EDTA- Blut mittels einer Zentrifuge (Hettich Zentrifugen, Universal 32 R) (10 min bei 2000 RPM) in EDTA-Plasma und korpuskuläre Bestandteile getrennt. Das EDTA-Plasma wurde in jeweils vier Mikroreaktionsgefäße (Eppendorf Safe-Lock Tubes, 2,0 mL) pipettiert und bis zur Testung und Weiterverarbeitung im Labor bei -80°C tiefgefroren.

Die Stuhlproben wurden mittels eines Stuhlprobenröhrchens (Böttger Stuhl Röhrchen 15ml) vom Patienten selbst oder durch Assistenz des medizinischen Personals entnommen. Dabei ist eine 2cm<sup>3</sup> Probe welche den Löffel bedeckt ausreichend. Diese wurden ebenfalls höchstens zwei Stunden später bei -20°C eingefroren.

### 3.4 Ein- und Ausschlusskriterien

Jene Probanden, welche histologisch gesicherte Karzinome in Magen, Pankreas oder Darm aufwiesen, wurden in das Kollektiv der erkrankten Studienteilnehmer inkludiert.

Minderjährige Patienten, Patienten nach entferntem Primärtumor, sowie nach Chemo- / Radio- oder Immuntherapie oder Patienten mit einem histologisch gesicherten gastrointestinalen Stromatumor (GIST), welcher sich immunhistochemisch deutlich von anderen Karzinomen des Verdauungstraktes unterscheidet, wurden ausgeschlossen (Catalano et al. 2005).

Patienten welche keine Einschlusskriterien erfüllten wurden ebenfalls ausgeschlossen.

In das Kollektiv der gesunden Studienteilnehmer (Kontrollen) fanden ausschließlich Probanden Eingang, welche durch eine nicht länger als ein halbes Jahr zurückliegende totale Koloskopie und Ösophago-Gastro-Duodenoskopie nachweislich keine pathologischen Befunde aufwiesen.

Insgesamt wurden 82 Personen in die Studie eingeschlossen. Dabei wiesen 11 Personen ein Magenkarzinom, 26 ein Pankreaskarzinom und 23 ein Darmkarzinom auf. Demgegenüber standen 22 gesunde Kontrollprobanden. Von den 82 Teilnehmern waren 50 männlich und 22 weiblich mit einem Durchschnittsalter von insgesamt 61,05 Jahren und einer Spannweite von 21 bis 86 Jahren.

Die folgende Tabelle listet die Ein- und Ausschlusskriterien.

**Tabelle 3: Ein- und Ausschlusskriterien**

|   | <b>Einschlusskriterien</b>                                     | <b>Ausschlusskriterien</b>                              |
|---|--|---|
| <b>Vorbedingung für die Interventionsgruppe</b> | histologisch gesicherte Karzinome in Magen, Pankreas oder Darm | histologisch gesicherter gastrointestinaler Stromatumor |

|  |   |  |
|--|---|--|
| <b>Vorbedingung für die Kontrollgruppe</b> | totale Koloskopie und Ösophago-Gastro-Duodenoskopie ohne Befund < 6 Mo  | Zustand nach erfolgter Tumorthherapie                                      |
| <b>Alter der Patienten</b>                 | 18 - 95 Jahre   | < 18 Jahre   |
| <b>Aufklärung</b>                          | schriftliche Bestätigung zur Aufklärung lag vor   | schriftliche Bestätigung zur Aufklärung lag nicht vor                      |
| <b>Datenschutzrichtlinien</b>              | schriftliche Einwilligungserklärung zur Verwendung der Daten lag vor  | schriftliche Einwilligungserklärung zur Verwendung der Daten lag nicht vor |
| <b>Probenentnahme</b>                      | korrekte Entnahme und Lagerung von Stuhl- und Plasmaprobe   | nicht lege artis durchgeführte Probenentnahme oder Lagerung                |
| <b>Testverfahren</b>                       | Sandwich-ELISA in Kombination mit jeweils 2 monoklonalen Antikörpern, die verschiedene Isoenzymformen der Pyrovatkinase erkannten |  |
| <b>primäre Endpunkte</b>                   | M2-PK Stuhlprobe; M2-PK Plasma; Calprotektin Stuhlprobe; verschiedenste Clone-Varianten   |  |

### **3.5 Datenschutz**

Es wurde nach Vorgabe für die Verarbeitung personenbezogener Daten der Europäischen Datenschutz-Grundverordnung (DS-GVO) (Artikel 12 ff. DS-GVO) verfahren. Die Studienteilnehmer wurden anhand einer Informationsschrift über die Aspekte zum Datenschutz informiert und gaben alle eine schriftliche Einverständniserklärung zur Erfassung, Speicherung und Weiterleitung ihrer personenbezogenen Daten sowie ihrer diesbezüglichen Rechte, ab.

### **3.6 Kooperation und Labor**

Die Bestimmung der Tumor M2-PK Konzentrationen und die Austestung neuer potenzieller Clone- Varianten erfolgte in Zusammenarbeit mit dem firmeneigenen Labor der Firma ScheBo® Biotech AG (Netanyastr. 3 in 35394 Gießen). Die Testung erfolgte mittels Sandwich-ELISA und zwei monoklonalen Antikörpern, die verschiedenen Isoenzymformen der Pyrovatkinase erkannten.

Je Platte konnten 96 Patientenproben getestet werden.

Die Messungen wurden von März bis 2019 bis Juli 2021 durchgeführt.

### **3.7 Testprinzip des ELISA**

Beim einem ELISA (engl. enzyme linked immunosorbent assay) handelt es sich um eine Methode zur Bestimmung der Konzentration von Antigenen oder Antikörpern in einer bestimmten Probe. Das Analysenprinzip eines ELISA beruht auf der spezifischen Wechselwirkung zwischen Antigenen (AG) und Antikörpern (AK). AK sind in der Lage, nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip bestimmte Moleküle (Antigene) zu erkennen und mit ihnen einen festen Antigen-Antikörper-Komplex zu bilden.

Eine häufig verwendete Form des ELISA ist der sogenannte Sandwichassay. Hierbei fängt einer auf einer Kunststoffoberfläche immobilisierter Antikörper (z. B. eine Vertiefung in einer microtiter®-Platte) den Testanalyten aus der Probe ein; ein weiterer Antikörper, der für einen anderen Teil des Analytmoleküls spezifisch ist, wird als Grundlage des Signalerzeugungssystems verwendet. Der Antikörper ist mit einem spezifischen Enzym markiert (beispielsweise alkalische Phosphatase oder Peroxidase), welches zum

colorimetrischen Nachweis benutzt werden kann. Da zwei Antikörper den Analyten einschließen, werden immunometrische Assays auch als Sandwich-Assays bezeichnet. Die letzte Stufe des Assays umfasst die Messung des Signalpegels. Der Signalpegel in dieser Art von Assay ist proportional zur Analytkonzentration in der Probe, die durch photometrische Messung der Farbintensität im Vergleich mit Standards bekannter Enzymaktivität ermittelt werden kann (Wild und John 2013).

Die nachfolgende Grafik veranschaulicht die verschiedenen Testschritte:

- (1) Beschichtung der Probe mit Antikörpern;
- (2) nicht-spezifische Bindungsstellen werden geblockt und Antigen wird hinzugefügt;
- (3) das Detektions-Antigen wird hinzugefügt;
- (4) das enzymkonjugierte Nachweisreagenz wird hinzugefügt;
- (5) Zugabe des Farbsubstrates und Ablesen der Platte, um das Vorhandensein und die Menge des Antigens zu bestimmen.

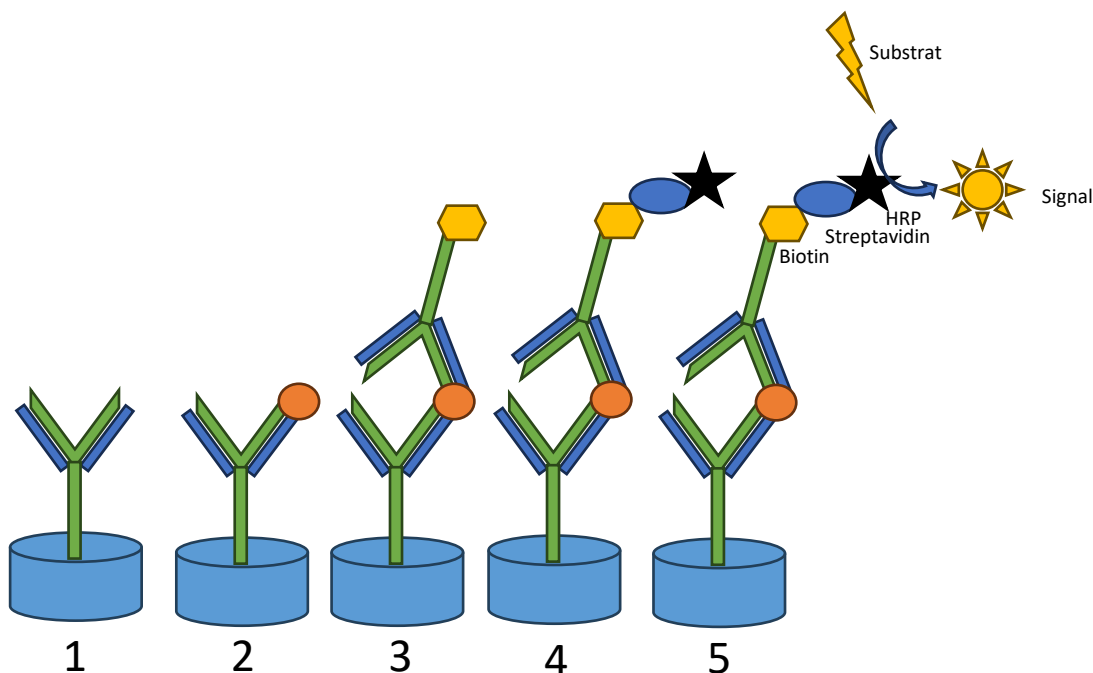


Abbildung 4: Sandwich-ELISA (eigene Abbildung in Anlehnung an (Aryal, 2020))

### **3.7.1 Testung der Stuhlproben auf Tu M2-PK**

Die Quantifizierung der Tu M2-PK erfolgte im Stuhl mittels des bereits kommerziell erhältlichen und in Deutschland etablierten ELISA der Firma ScheBo®•Biotech AG (Gießen, Germany).

Die Messungen beruhen auf dem Prinzip eines Sandwich-ELISA mit zwei monoklonalen Antikörpern, die hoch spezifisch für die Tumor M2-PK (dimere Form der M2-Pyruvatkinase) sind und nicht mit anderen Isoformen der Pyruvatkinase (Typ L, R, M1 und tetramere M2) reagieren.

Der Test erfolgte mittels einer 96 Wells Mikrotiterplatte, in welche die zu untersuchenden Proben pipettiert wurden. Am Boden jeder Vertiefung befand sich der immobilisiert monoklonale Antikörper, der spezifisch das Isoenzym der humanen Pyruvatkinase Tu M2 erkennt.

#### **3.7.1.1 Messbereich und Präzision**

Gemäß der Testanleitung vom Januar 2019, erlaubt das Testkit eine

Konzentrationsbestimmung der Tumor M2-PK im Messbereich von 1 bis 20 U/ml.

Die Intraassay-Varianz wird durch zwanzigfache Bestimmung von fünf Stuhlproben ermittelt.

Der mittlere Variationskoeffizient (VK) liegt bei 9,9% (5,8-14,6%).

Die Interassay-Varianz wird anhand 8 Stuhlproben, die an zehn verschiedenen Tagen bestimmt werden berechnet. Der mittlere VK liegt bei 9,0% (7,8-10,4%) (ScheBo ® Biotech AG 2019a).

### 3.7.1.2 Messung TU M2-PK

Die nachfolgenden Verlaufsdiagramme verdeutlichen das Vorgehen bei den Testungen auf Tu M2-PK

**Tabelle 4: Vorbereitung der Messungen der Stuhlproben (eigene Darstellung in Anlehnung an (ScheBo Biotech AG)**

| Vorbereitung  |
|---|
| Extraktion der Stuhlproben  |
| Die Extraktion der Stuhlproben erfolgte unter Verwendung des Probenvorbereitungssystems Master Quick- Prep von ScheBo Biotech AG. Dieses gewährleistet bei jeder Probe die gleiche Menge zu testen. Flüssige Stuhlproben wurden durch ein aufwendiges Verfahren exakt abgewogen und alle weiteren Schritte dementsprechend berechnet und angepasst. |
| Herstellung des Proben-/ Waschlösungspuffers  |
| 100ml Proben-/ Waschlösungspuffer + 400ml H <sub>2</sub> O  |
| Rekonstruierung der lyophilisierten Standards und Kontrollen  |
| Zugabe von je 700µl Proben-/ Waschlösungspuffer   |

**Tabelle 5: Testdurchführung Tu M2-PK-Test**

| Testdurchführung   |
|--|
| Pipettierung und Inkubation der Doppelwerte  |
| je 50 µl Blank (Proben-/Waschlösungspuffer), Standards 1-4, Kontrolle und Proben wurden als Doppelwerte in die ELISA-Platte pipettiert und im Anschluss 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. |
| Waschvorgang   |
| der Inhalt der Vertiefungen wurde ausgeklopft. Die Vertiefungen wurden dreimal mit je 250µl Proben-/Waschlösungspuffer gewaschen.  |
| Pipettierung und Inkubation des zweiten Antikörpers  |
| jeweils 50µl des zweiten Antikörpers anti Tumor M2-PK–Biotin-POD-Streptavidin-Komplex wurden pro Vertiefung hinzugegeben. Die Probe wurde abgedunkelt 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.   |
| Waschvorgang   |

|   |
|---|
| der Inhalt der Vertiefungen wurde ausgeklopft. Die Vertiefungen wurden dreimal mit je 250µl Proben-/Waschpuffer gewaschen.                        |
| <b>Farbmarkierung und Inkubation</b>  |
| Für die Farbreaktion wurde 100 µl TBM- Substratlösung (gebrauchsfertig) zugegeben und erneut abgedunkelt 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. |
| <b>Abstoppung der Farbreaktion</b>  |
| zur Abstoppung der Farbreaktion erfolgte die Zugabe von 100 µl TMB-Stopplösung (gebrauchsfertig).   |
| <b>Messung der optischen Dichte</b>   |
| die Messung der optischen Dichte (OD) wurde mittels Photometer bei 405 nm oder 405-492 nm durchgeführt.   |
| <b>Auswertung</b>   |
| Die Auswertung erfolgte mittels doppellogarithmischer Standardkurve (ScheBo ® Biotech AG 2019a)   |

### 3.7.2 Testung der Plasmaproben

Die Quantifizierung der Tu M2-PK im Plasma erfolgte analog der Testung der Stuhlproben. Ein ELISA der Firma ScheBo®•Biotech AG (Giessen, Deutschland) für EDTA Plasma wurde hierbei verwendet.

#### 3.7.2.1 Messbereich und Präzision der Plasmaproben

Gemäß der Testanleitung vom Januar 2019, erlaubte das Testkit eine Konzentrationsbestimmung der Tumor M2-PK im Messbereich von 5-100 U/ml EDTA-Plasma.

Die Intraassay-Varianz wurde durch zwanzigfache Bestimmung von sechs Stuhlproben ermittelt. Der mittlere Variationskoeffizient (VK) lag bei 5,7% (3,6-7,6%).

Die Interassay-Varianz wurde anhand dieser sechs EDTA-Proben, die an zehn verschiedenen Tagen bestimmt wurden, berechnet. Der mittlere VK lag bei 9,2% (8,3-9,9%) (ScheBo ® Biotech AG 2019a).

### 3.7.2.2 Messung der Plasmaproben

**Tabelle 6: Vorbereitung der Messungen der Plasmaproben (eigene Darstellung in Anlehnung an (ScheBo Biotech AG))**

| Vorbereitung   |
|--|
| Herstellung des Proben-/ Waschpuffers                        |
| 100ml Proben-/ Waschpuffer + 400ml H <sub>2</sub> O          |
| Rekonstruierung der lyophilisierten Standards und Kontrollen |
| Zugabe von je 700µl Proben-/ Waschpuffer                     |
| Verdünnung der zu untersuchenden EDTA- Plasmen               |
| 10µl EDTA- Plasma + 1000µl Proben-/Waschpuffer               |

**Tabelle 7: Testdurchführung Plasmaproben**

| Testdurchführung   |
|--|
| Pipettierung und Inkubation der Doppelwerte  |
| je 50 µl Blank (Proben-/Waschpuffer), Standards 1-4, Kontrolle und die verdünnten Proben wurden als Doppelwerte in die ELISA-Platte pipettiert und im Anschluss 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. |
| Waschvorgang   |
| der Inhalt der Vertiefungen wurde ausgeklopft. Die Vertiefungen wurden dreimal mit je 250µl Proben-/Waschpuffer gewaschen.   |
| Pipettierung und Inkubation des zweiten Antikörpers  |
| jeweils 50µl des zweiten Antikörpers anti Tumor M2-PK–Biotin-POD-Streptavidin-Komplex wurden pro Vertiefung hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte abgedunkelt für 30 min. bei Raumtemperatur.            |
| Waschvorgang   |
| der Inhalt der Vertiefungen wurde ausgeklopft. Die Vertiefungen wurden dreimal mit je 250µl Proben-/Waschpuffer gewaschen.   |
| Farbmarkierung und Inkubation  |
| für die Farbreaktion wurde 100 µl TBM- Substratlösung (gebrauchsfertig) zugegeben und erneut abgedunkelt 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.  |
| Abstoppung der Farbreaktion  |

|  |
|--|
| zur Abstopfung der Farbreaktion erfolgte die Zugabe von 100 µl TMB-Stopplösung (gebrauchsfertig).                  |
| Messung der optischen Dichte   |
| die Messung der optischen Dichte (OD) erfolgte mittels Photometer bei 405 nm 5-30 min. nach Zugabe der Stopplösung |
| Auswertung   |
| die Auswertung erfolgte mittels doppellogarithmischer Standardkurve (ScheBo ® Biotech AG 2019b)                    |

### 3.7.3 Antikörperbestand

Die nachfolgenden Tabellen listen den Antikörperbestand; zunächst unkonjugiert und dann biotinyliert.

**Tabelle 8: Antikörper unkonjugiert**

| Antikörper    | Generierungsdatum | Konzentration |
|---------------|-------------------|---------------|
| <b>Klon A</b> | 28.03.2001        | 55,6µg/ml     |
|               | 05.06.2018        | 64,84µg/ml    |
| <b>Klon B</b> | 07.02.2001        | 241,6µg/ml    |
|               | 15.05.2018        | 3512µg/ml     |
| <b>Klon C</b> | 13.02.2001        | 269µg/ml      |
|               | 23.10.2018        | 150,87µg/ml   |
| <b>Klon D</b> | 13.02.2001        | 430µg/ml      |
|               | 17.04.2018        | 615,37µg/ml   |
| <b>Klon E</b> | 18.10.2011        | 656,5µg/ml    |
| <b>Klon F</b> | 07.06.2011        | 651µg/ml      |
| <b>Klon G</b> | 13.02.2019        | 928,38µg/ml   |
| <b>Klon H</b> | 06.03.2001        | 320,6µg/ml    |

**Tabelle 9: Antikörper biotinyliert**

| <b>Antikörper</b> | <b>Generierungsdatum</b> | <b>Biotinylierungsdatum</b> | <b>Konzentration</b> |
|-------------------|--------------------------|-----------------------------|----------------------|
| <b>Klon A</b>     | 17.08.2000               | -                           | 94,6 U/ml            |
|                   | 05.06.2018               | 19.09.2018                  | 32,11 U/ml           |
| <b>Klon B</b>     | 28.03.2001               | -                           | 163,4 U/ml           |
|                   | 15.05.2018               | 18.05.2018                  | 187,83 U/ml          |
| <b>Klon C</b>     | 28.03.2001               |                             | 140,15 U/ml          |
|                   | 23.10.2018               | 12.02.2019                  | 132,58 U/ml          |
| <b>Klon D</b>     | 28.03.2001               |                             | 150 U/ml             |
|                   | 23.10.2018               | 18.04.2018                  | geschätzt            |
| <b>Klon E</b>     |                          | 30.11.2011                  | 653 U/ml             |
| <b>Klon F</b>     |                          | 30.11.2011                  | 563 U/ml             |
| <b>Klon G</b>     | 13.02.2019               | 19.02.2019                  | 208,90 U/ml          |
| <b>Klon I</b>     | 17.02.2015               | 19.02.2015                  | 195 U/ml             |
| <b>Klon H</b>     |                          | 12.01.2015                  | 276,22 U/ml          |

#### **3.7.4 Austestung der Clone-Varianten**

Zu Beginn wurde in jedes Reaktionsgefäß der ELISA- Platte (Maxisorp; Nunc, Wiesbaden) 70µl PBS mit jeweils 2ng/ml Antikörperlösung (Clonevarianten) vorgelegt. Im Anschluss wurde die ELISA-Platte bei 4°C über Nacht intubiert, damit der zu testende Antikörperklon fest auf der Mikrotiterplatte binden konnte. Am nächsten Tag wurde die Suspension entnommen und die Platte viermal mit jeweils 250ul PBST gewaschen. Daraufhin wurde sie erneut mit 250µl PBS befüllt und bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

Die nächste Tabelle zeigt die Zusammensetzung des PBS.

**Tabelle 10: Zusammensetzung PBS**

|  | <b>MW</b> | <b>Endkonzentration(1)</b> | <b>1x, 1l</b> |
|--|-----------|----------------------------|---------------|
| <b>NaCl</b>  | 58,44     | 140,0mM                    | 8,18g         |
| <b>Di-Natrium- Hydrogen- Phosphat<br/>Dihydrat<br/>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> X 2H<sub>2</sub>O</b> | 177,95    | 10,0mM                     | 1,77g         |
| <b>KCL</b>   | 74,56     | 2,7mM                      | 0,20g         |
| <b>Kalium- Di- Hydrogen- Phosphat<br/>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>                                 | 136,09    | 1,8mM                      | 0,24g         |

**Tabelle 11: Testdurchführung der Clone-Varianten**

| <b>Testdurchführung</b>   |
|---|
| <b>Vorbereitung der Proben</b>  |
| die beschichtete Platte wurde aus der 4°C Kühlung entnommen und die Flüssigkeit entfernt  |
| <b>Pipettierung und Inkubation</b>  |
| jeweils 50µl der zu testenden Patientenprobe (Stuhl oder Serum) wurden in die Kavitäten der ELISA- Platte pipettiert und bei Raumtemperatur für 60 min. inkubiert, damit der Antikörper, welcher sich auf der Platte befand, an die jeweiligen Antigene der Patientenprobe binden konnte. |
| <b>Waschvorgang</b>   |
| die Flüssigkeit wurde erneut entfernt und jedes Well mit jeweils 250µl Probenwaschpuffer (ScheBo Bioteck AG. Gießen) dreimal gewaschen, um die nichtgebundenen Bestandteile zu entfernen.   |
| <b>Pipettierung und Inkubation des biotinylierten Zweitantikörpers</b>  |
| jeweils 250ul von dem biotinylierten Zweitantikörper (Verdünnung 1:5000 in 50ul PBS) wurden zu jeder Probe hinzugegeben und weitere 60 min. im Dunkeln bei Raumtemperatur intubiert. Anschließend wurde erneut dreimal mit Probenwaschpuffer gewaschen.                                   |
| <b>Waschvorgang</b>   |
| anschließend wurde erneut dreimal mit Probenwaschpuffer gewaschen.  |
| <b>Detektion mittels Peroxidase</b>   |
| für die Färbung wurden 100ul Substrat- Fertiglösung (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin,Merck, Darmstadt) pro Reaktionsansatz hinzugegeben; es resultierte eine Blaufärbung.   |
| <b>Abstoppung der Farbreaktion</b>  |
| nach 15 Minuten wurden 100ul Stopplösung (12,5% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 7,0 ml konz H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ad 100 ml H <sub>2</sub> O, Merck, Darmstadt) zugegeben; dadurch entstand ein Farbumschlag von blau zu gelb   |
| <b>Extinktionsbestimmung</b>  |
| es erfolgte die Extinktionsmessung bei 450 nm im ELISA- Reader (ELISA Reader Infinite f50 Fa. Tecan, Männedorf, Schweiz).   |

## 4 Ergebnisse: Statistische Analyse

Die metrisch skalierten Konzentrationen der Klonkombinationen in Plasma oder Stuhl wurden initial auf Normalverteilung anhand des QQ-Plots, des Histogramms und des Kolmogorov Smirnov-Tests geprüft. Da in keinem Fall eine Normalverteilung vorlag wurden jeweils der Median, sowie das 25. und 75. Perzentil berichtet (Median [25., 75. Perzentil]). Geeignete Klonkombinationen wurden anhand der deskriptiven Statistik identifiziert, in dem in Teil 1 der Analyse die Konzentration der jeweiligen Klonkombinationen zwischen gesunden Kontrollen und allen Karzinompatienten deskriptiv verglichen wurden. War der Median der an Karzinomen erkrankten Personen höher als der der gesunden Kontrollen, qualifizierte sich die entsprechende Klonkombination für den weiteren inferenzstatistischen Vergleich.

In Teil 2 der Analyse wurden die Proben der an Karzinomen erkrankten Patienten in 3 Gruppen eingeteilt: Patienten mit Magen-, Pankreas- oder Darmkarzinom. Auch hier qualifizierten sich Klonkombinationen für den inferenzstatistischen Vergleich deren Konzentrationen für die Karzinompatienten, über denen der gesunden Patienten lag.

Innerhalb der inferenzstatistischen Auswertung wurden dann für den Vergleich gesunde Kontrollen vs. Karzinompatienten pro Klonkombination ein Mann-Whitney U-Test gerechnet und für den 4-Gruppenvergleich (gesund vs. Magen-, Pancreas- oder Darmkarzinom) initial ein Kruskal-Wallis Test, der im Falle einer Signifikanz mit weiteren Mann-Whitney U-Tests ausdifferenziert wurde. Für jeden Mann-Whitney U-Test wurde dabei zur besseren Einordnung des Effekts die Effektstärke  $r$  berichtet. Ein kleiner Effekt ist dabei durch  $r = 0.1$  normiert, ein mittelgroßer Effekt durch  $r = 0.3$  und ein großer Effekt durch  $r = 0.5$ .

Die Analyse der Daten erfolgte in SPSS 28.0.

## 4.1 Gesund vs. Karzinom

### 4.1.1 Deskriptive Statistik M2-PK im Stuhl

Bei den gesunden Kontrollen zeigte sich für das M2-PK mit 1,55 [0,75; 3,19] U/ml eine sich im Referenzbereich (< 6 U/ml) befindende Konzentration. Für alle an Karzinomen erkrankten Personen zeigte sich eine mediane Konzentration von 3,99 [0,79; 20,0] U/ml im Stuhl, die ebenfalls noch im Referenzbereich lag. Die Streuung der Daten war allerdings in der Gruppe der Karzinompatienten deutlich erhöht (siehe Abbildung 6 und Tabelle 13).

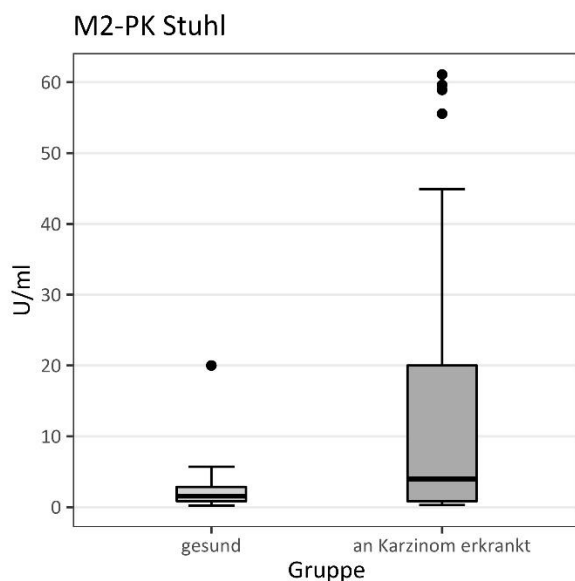


Abbildung 5: Konzentration M2-PK in U/ml im Stuhl: Gesund vs. Karzinompatienten

### 4.1.2 Deskriptive Statistik für weitere Klonkombinationen im Stuhl

Innerhalb der weiteren gemessenen 11 Klonkombinationen im Stuhl zeigte sich, dass insbesondere die Klonkombinationen Klon B mit C, D mit D, D mit C, D mit B, C mit D, sowie C mit C in der Deskriptiven Statistik höhere Konzentrationen bei den an Karzinomen leidenden Patienten aufwiesen als die gesunden Kontrollen (Siehe Tabelle 13). Somit qualifizierten sich diese Klonkombinationen für den folgenden inferenzstatistischen Vergleich.

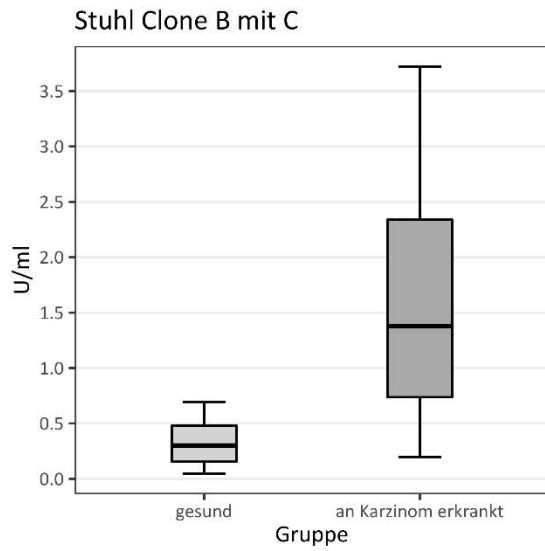
**Tabelle 12: Konzentration verscheidender Klonkombinationen im Stuhl: Gesund vs. Karzinompatienten**

| Stuhl                | Gesunde KG                | N  | an Karzinom erkrankt      | N  |
|----------------------|---------------------------|----|---------------------------|----|
| M2PK im Stuhl (U/ml) | 1,55 [0,75; 3,19]         | 22 | 3,99 [0,79; 20,0]         | 51 |
| Klon B mit B         | 0,049 [0,04; 0,09]        | 3  | -0,01 [-0,02; 0,02]       | 26 |
| Klon B mit D         | 0,00 [-0,03; 0,31]        | 7  | -0,03 [-0,05; 0,23]       | 37 |
| Klon B mit D Bio     | 0,80 [0,52; 0,97]         | 3  | 0,23 [0,01; 0,77]         | 26 |
| Klon B mit C         | <b>0,30 [0,08; 0,62]</b>  | 4  | <b>1,38 [0,66; 2,56]</b>  | 10 |
| Klon D mit D         | <b>0,02 [-0,41; 0,40]</b> | 7  | <b>0,69 [0,23; 1,45]</b>  | 35 |
| Klon D mit C         | <b>0,28 [0,06; 2,30]</b>  | 4  | <b>2,29 [1,55; 2,95]</b>  | 10 |
| Klon D mit B         | <b>0,11 [0,06; 0,52]</b>  | 7  | <b>0,27 [-0,21; 1,39]</b> | 37 |
| Klon C mit D         | <b>0,27 [0,09; 3,07]</b>  | 4  | <b>2,92 [1,81; 3,06]</b>  | 11 |
| Klon C mit C         | <b>0,41 [0,30; 2,42]</b>  | 4  | <b>2,83 [1,85; 3,08]</b>  | 10 |
| Klon C mit B         | -0,37 [-0,92; 0,02]       | 7  | -0,01 [-0,03; 0,14]       | 36 |
| Klon C mit Bio       | 0,93 [0,47; 1,12]         | 3  | 0,43 [0,07; 0,90]         | 26 |

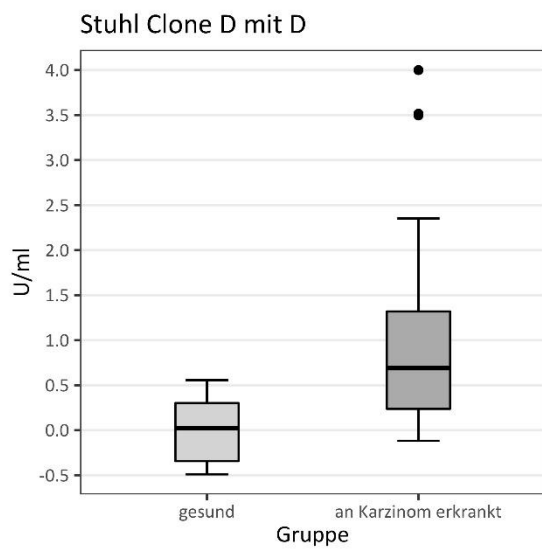
#### 4.1.3 Statistischer Vergleich der weiteren Klonkombinationen im Stuhl

Im Rahmen des inferenzstatistischen Analyse zeigte sich, dass Patienten, die an einem Karzinom erkrankt waren, eine signifikant höhere Konzentration der Klonkombination B mit C und D mit D aufwiesen im Vergleich zu den gesunden Kontrollen (B mit C: Karzinom: 1,38 [0,66; 2,56] U/ml vs. gesunde Kontrollen: 0,30 [0,08; 0,62] U/ml,  $p = 0,024$ ,  $r = 0,60$ ; D mit D: Karzinom: 0,69 [0,23; 1,45] vs. gesunde Kontrollen: 0,02 [-0,41; 0,40],  $p = 0,006$ ,  $r = 0,42$ , siehe Abbildung 7, 8 ). Die Effektstärke  $r$  entsprach dabei für D mit D einem mittelgroßen und für B mit C einem großen Effekt.

Für alle weiteren innerhalb der deskriptiven Statistik als vielversprechend identifizierten Klonkombinationen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden werden (D mit C:  $p = 0,09$ ,  $r = 0,45$ ; C mit D:  $p = 0,133$ ,  $r = 0,39$ ; D mit B:  $p = 0,987$ ,  $r = 0,002$ , C mit C:  $p = 0,106$ ,  $r = 0,45$ ).



**Abbildung 6: Konzentration Klonkombination B mit C im Stuhl: Gesund vs. Karzinompatienten**



**Abbildung 7: Konzentration Klonkombination D mit D im Stuhl: Gesund vs. Karzinompatienten**

#### 4.1.4 Deskriptive Statistik M2-PK im Plasma

Bei den gesunden Kontrollen zeigte sich für das M2-PK im Plasma mit 15,00 [10,32; 18,88] U/ml wiederum eine sich im Referenzbereich der Gesunden ( $< 25$  U/ml) liegende Konzentration. Für alle an Karzinomen erkrankten Personen zeigte sich eine mediane Konzentration von 81,94 [36,20; 163,85] U/ml und somit eine wie erwartet erhöhte Konzentration des M2-PK (siehe Abbildung 9 und Tabelle x).

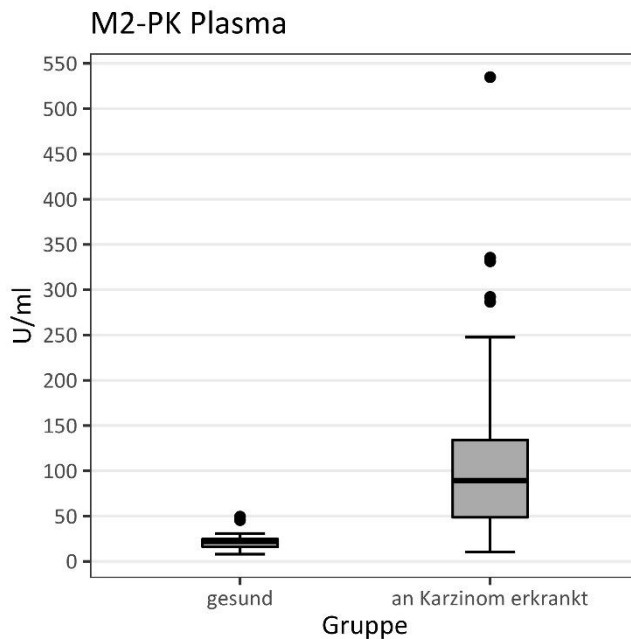


Abbildung 8: Konzentration M2-PK in U/ml im Plasma: Gesund vs. Karzinompatienten

#### 4.1.5 Deskriptive Statistik für weitere Klonkombinationen im Plasma

Innerhalb der weiteren gemessenen 8 Klonkombinationen im Plasma zeigte sich, dass insbesondere die Klonkombinationen Klon D mit C, C mit D und C mit C in der Deskriptiven Statistik höhere Konzentrationen bei den an Karzinomen leidenden Patienten aufwiesen im Vergleich zu den gesunden Kontrollen (siehe Tabelle 14). Somit qualifizierten sich diese Klonkombinationen für den folgenden inferenzstatistischen Vergleich.

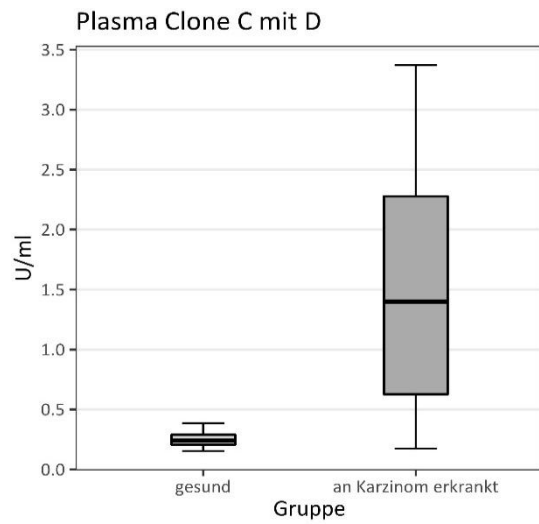
**Tabelle 13: Konzentration verschiedenen Klonkombinationen im Plasma: Gesund vs. Karzinompatienten**

| <b>Plasma</b>         |                            |          |                             |          |
|-----------------------|----------------------------|----------|-----------------------------|----------|
|                       | <b>Gesunde KG</b>          | <b>N</b> | <b>an Karzinom erkrankt</b> | <b>N</b> |
| <b>M2PK im Plasma</b> | 22,00 [15,00; 26,17]       | 17       | 89,27 [46,54; 135,11]       | 60       |
| <b>Klon B mit D</b>   | 0,26 [0,13; 0,48]          | 12       | 0,13 [0,08; 0,26]           | 50       |
| <b>Klon B mit C</b>   | 0,10 [-0,10; 0,54]         | 4        | -0,12 [-0,20; -0,01]        | 19       |
| <b>Klon D mit D</b>   | 0,04 [-0,14; 0,09]         | 4        | 0,03 [-0,10; 0,19]          | 19       |
| <b>Klon D mit C</b>   | <b>-0,04 [-0,75; 0,18]</b> | 4        | <b>0,41 [0,05; 1,22]</b>    | 19       |
| <b>Klon D mit B</b>   | 0,04[0,75; 0,37]           | 12       | -0,52 [0,75; 0,37]          | 50       |
| <b>Klon C mit D</b>   | <b>0,24 [0,17; 0,35]</b>   | 4        | <b>1,40 [0,59; 2,34]</b>    | 19       |
| <b>Klon C mit C</b>   | <b>-0,03 [-0,16; 0,07]</b> | 4        | <b>0,71 [0,17; 1,78]</b>    | 19       |
| <b>Klon C mit B</b>   | 0,11 [-0,48; 0,56]         | 12       | -0,08 [-0,53; 0,08]         | 50       |

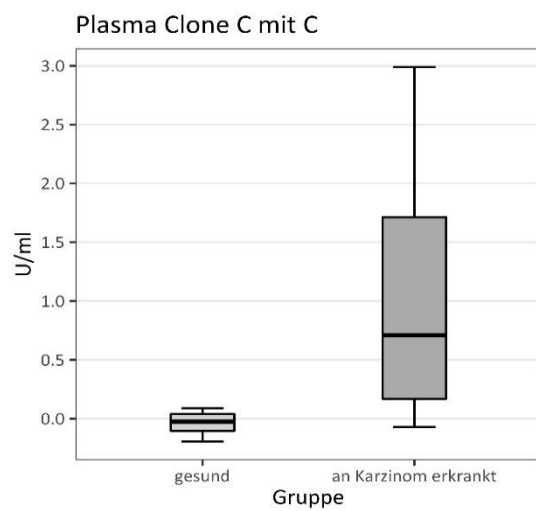
#### 4.1.6 Statistischer Vergleich der weiteren Klonkombinationen im Plasma

Die inferenzstatistische Auswertung ergab, dass Patienten, die an einem Karzinom erkrankt waren im Vergleich zu den gesunden Kontrollen eine signifikant höhere Konzentration der Klonkombination C mit D und C mit C im Plasma aufwiesen (C mit D: Karzinom: 1,40 [0,59; 2,34] U/ml vs. gesunde Kontrollen: 0,24 [0,17; 0,35] U/ml,  $p = 0,006$ ,  $r = 0,58$ ; C mit C: Karzinom: 0,71 [0,17; 1,78] vs. gesunde Kontrollen: -0,03 [-0,16; 0,07],  $p = 0,009$ ,  $r = 0,54$ , siehe Grafik x). Für die Klonkombination D mit C fand sich ein sehr starker Trend zur Signifikanz (Karzinom: 0,41 [0,05; 1,22] vs. gesunde Kontrollen: -0,04 [-0,75; 0,18],  $p = 0,052$ ,  $r = 0,41$ , siehe Grafik x).

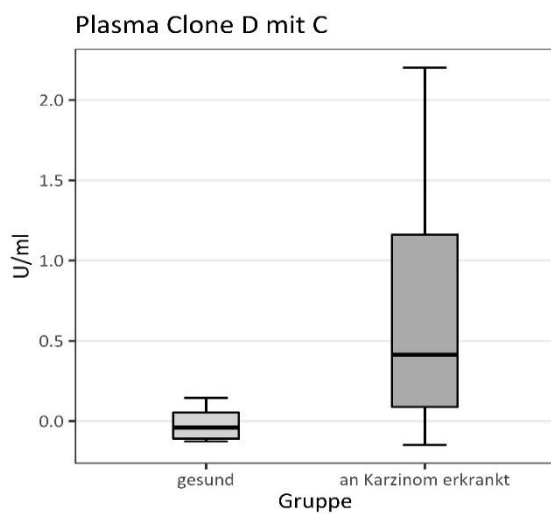
Die Effektstärke  $r$  entsprach dabei für D mit C einem mittelgroßen und für C mit D, sowie C mit C einem großen Effekt.



**Abbildung 9: Konzentration Klonkombination C mit D im Plasma: Gesund vs. Karzinompatienten**



**Abbildung 10: Konzentration Klonkombination C mit C im Plasma: Gesund vs. Karzinompatienten**



**Abbildung 11: Konzentration Klonkombination D mit C im Plasma: Gesund vs. Karzinompatienten**

## 4.2 Gesund vs. Magen-/Pancreas-/ Darm-Karzinom

### 4.2.1 M2-PK im Stuhl 4 Gruppen

Die geringste Konzentration von M2-PK im Stuhl konnte mit 1,55 [0,75; 3,19] U/ml im Median bei den gesunden Patienten gefunden werden. Bei Patienten mit Magenkarzinom wurde eine Konzentration von 1,84 [0,73; 20,00] U/ml gemessen, bei Patienten mit Pankreaskarzinom von 7,40 [0,79; 35,56] U/ml und bei Patienten mit Darmkarzinom von 7,48 [1,47; 20,00] U/ml (siehe Abbildung 13 und Tabelle 15). Somit wiesen die gesunden Kontrollen und die Patienten mit Magenkarzinom eine M2-PK Konzentration innerhalb des Referenzbereichs (< 6 U/ml) auf, während Patienten mit Pancreas- oder Darmkarzinom im Median leicht oberhalb des Referenzbereichs lagen.

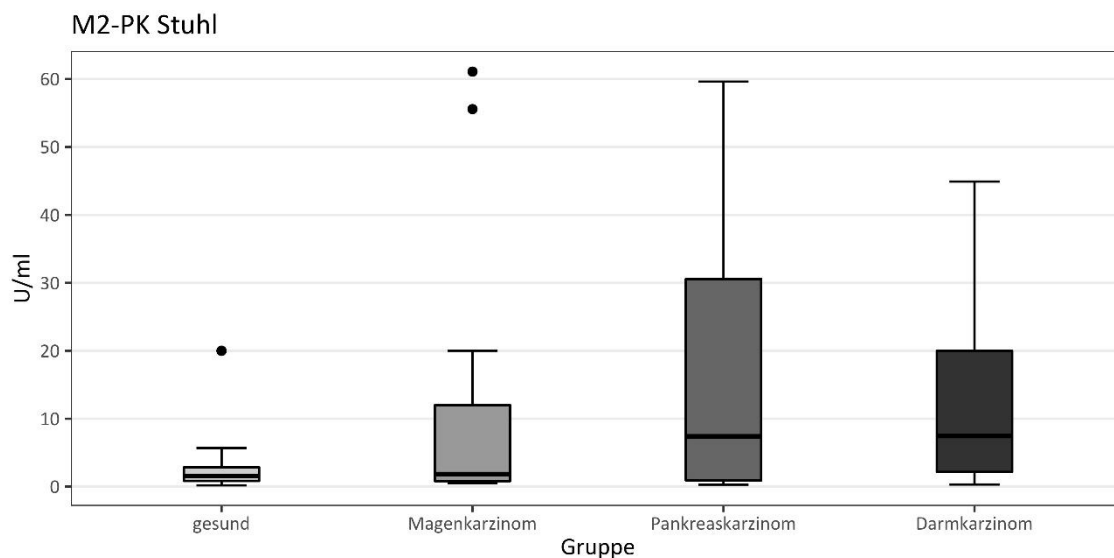


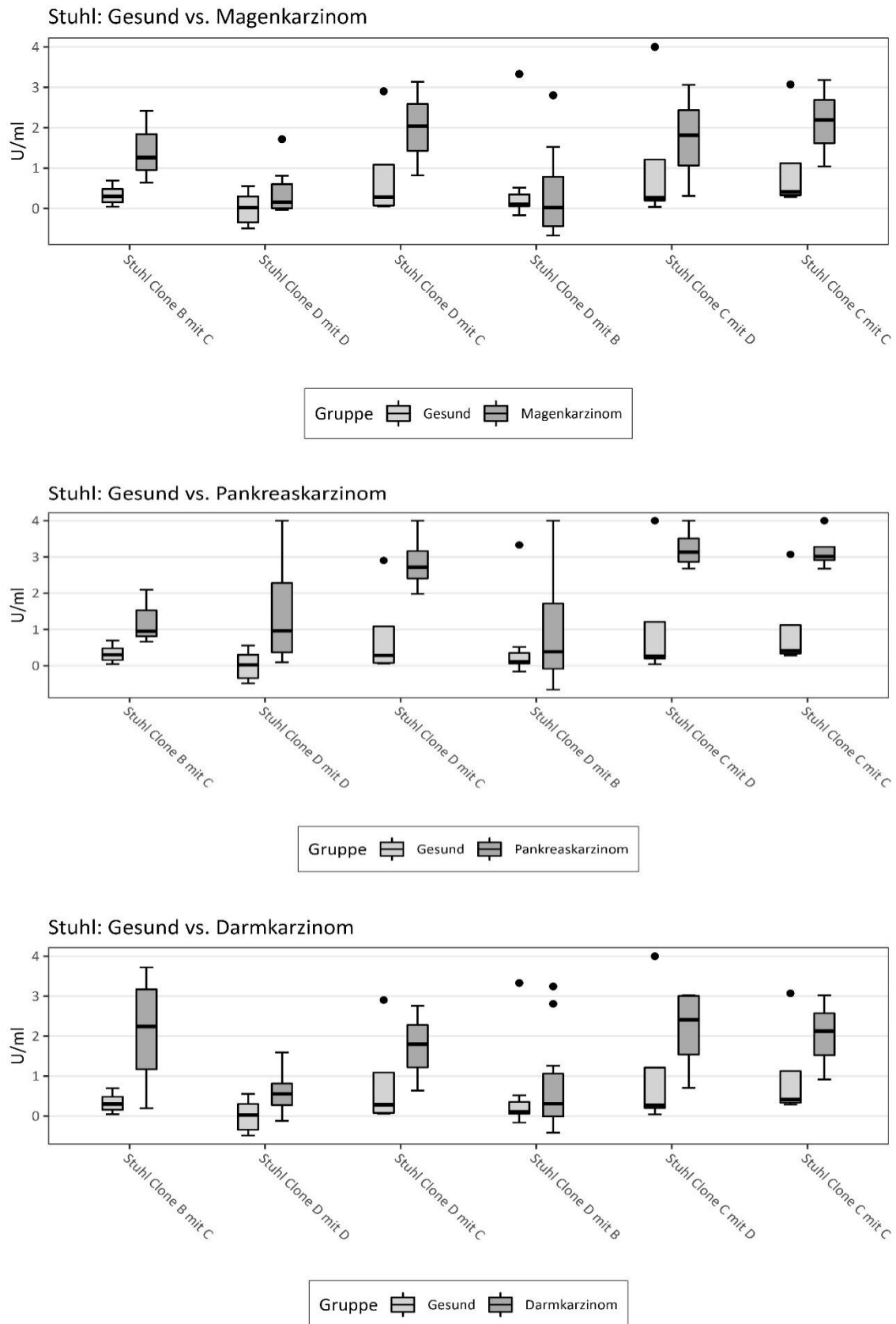
Abbildung 12: Konzentration von M2- PK im Stuhl: Gesund vs. Magen-/Pancreas-/ Darm-Karzinom

#### 4.2.2 Weitere Klonkombinationen im Stuhl 4 Gruppen

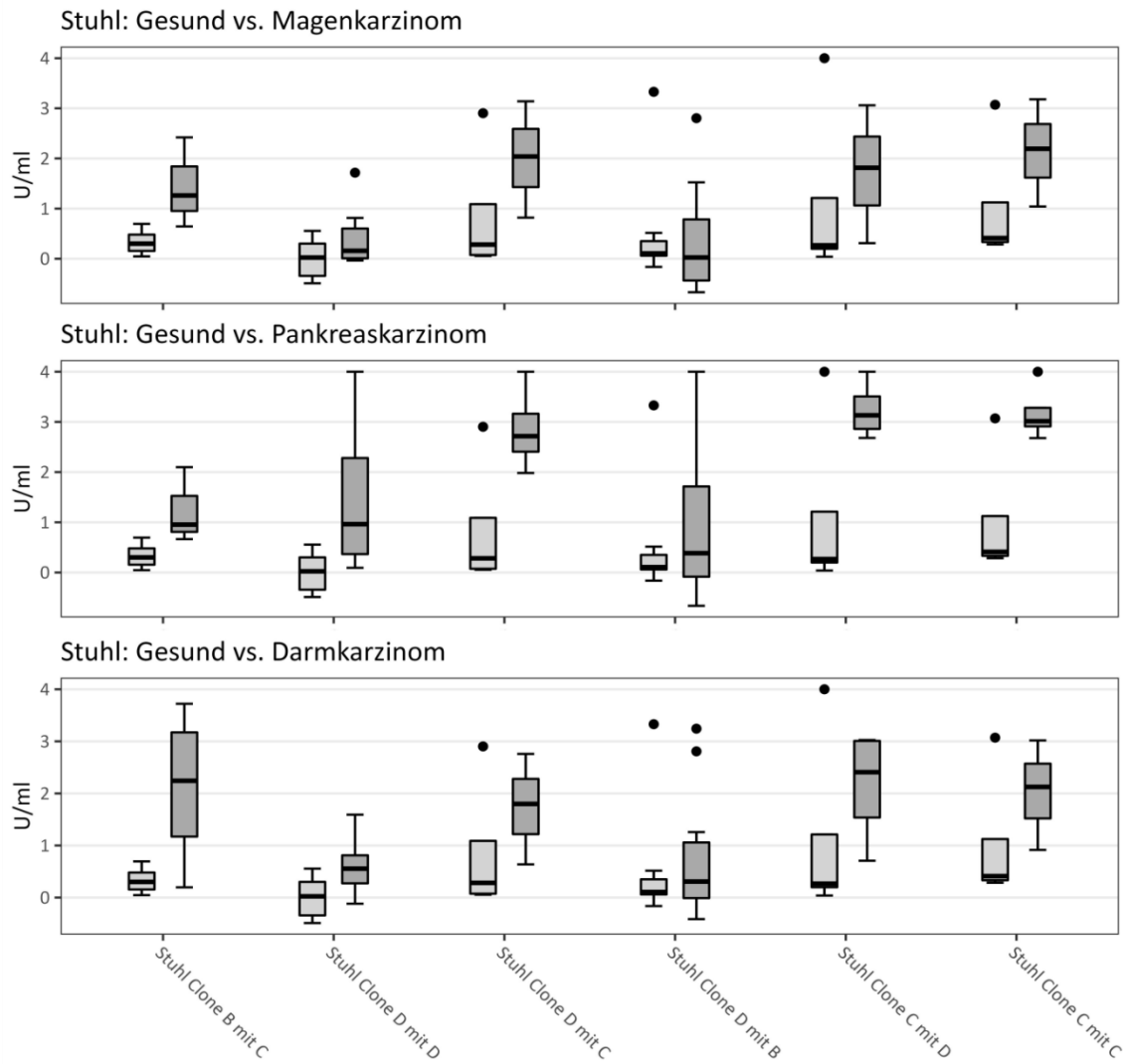
Innerhalb der weiterhin gemessen 11 Klonkombinationen im Stuhl zeigte sich, dass insbesondere die Klonkombinationen B mit C, D mit D, D mit C, D mit B, C mit D und C mit C potenziell sensitiv auf Karzinome reagierten, da sie deskriptiv höhere Konzentrationen in Patienten mit Karzinomen aufwiesen als solche innerhalb der gesunden Kontrollen (siehe Tabelle 14). Somit qualifizierten sie sich für einen weiteren inferenzstatistischen Vergleich der Gruppen.

**Tabelle 14: Konzentration verschiedener Klonkombinationen im Stuhl: Gesund vs. Magen-/Pancreas-/Darm-Karzinom**

| Stuhl                   | Gesunde KG                |    | Magenkarzinom             |    | Pankreaskarzinom          |    | Darmkarzinom              |    |
|-------------------------|---------------------------|----|---------------------------|----|---------------------------|----|---------------------------|----|
|                         |                           | N  |                           | N  |                           | N  |                           | N  |
| <b>M2PK im Stuhl</b>    | 1,55 [0,84; 2,84]         | 22 | 1,84 [0,81; 12,00]        | 11 | 7,40 [0,92; 30,57]        | 19 | 7,48 [2,16; 20,00]        | 21 |
| <b>Klon B mit B</b>     | 0,05 [0,04; 0,09]         | 3  | 0,01 [0,00; 0,02]         | 5  | 0,00 [-0,02; 0,01]        | 13 | -0,01 [-0,02; 0,01]       | 8  |
| <b>Klon B mit D</b>     | 0,00 [-0,03; 0,16]        | 7  | 0,02 [-0,03; 0,19]        | 8  | -0,03 [-0,05; 0,01]       | 17 | -0,04 [-0,05; 0,15]       | 12 |
| <b>Klon B mit D Bio</b> | 0,80 [0,66; 0,97]         | 3  | 0,11 [-0,07; 0,68]        | 5  | 0,24 [0,15; 0,67]         | 13 | 0,15 [0,01; 0,78]         | 8  |
| <b>Klon B mit C</b>     | <b>0,30 [0,16; 0,48]</b>  | 4  | <b>1,26 [0,95; 1,84]</b>  | 3  | <b>0,95 [0,81; 1,53]</b>  | 3  | <b>2,24 [1,17; 3,17]</b>  | 4  |
| <b>Klon D mit D</b>     | <b>0,02 [-0,34; 0,30]</b> | 7  | <b>0,16 [0,01; 0,60]</b>  | 7  | <b>0,96 [0,37; 2,28]</b>  | 17 | <b>0,56 [0,27; 0,81]</b>  | 11 |
| <b>Klon D mit C</b>     | <b>0,28 [0,07; 1,09]</b>  | 4  | <b>2,04 [1,43; 2,59]</b>  | 3  | <b>2,72 [2,41; 3,16]</b>  | 4  | <b>1,80 [1,22; 2,28]</b>  | 3  |
| <b>Klon D mit B</b>     | <b>0,11 [0,06; 0,35]</b>  | 7  | <b>0,02 [-0,44; 0,78]</b> | 7  | <b>0,38 [-0,08; 1,71]</b> | 16 | <b>0,31 [-0,01; 1,06]</b> | 14 |
| <b>Klon C mit D</b>     | <b>0,27 [0,20; 1,21]</b>  | 4  | <b>1,81 [1,06; 2,44]</b>  | 3  | <b>3,13 [2,86; 3,51]</b>  | 4  | <b>2,41 [1,54; 3,01]</b>  | 4  |
| <b>Klon C mit C</b>     | <b>0,41 [0,33; 1,12]</b>  | 4  | <b>2,19 [1,62; 2,69]</b>  | 3  | <b>3,01 [2,91; 3,28]</b>  | 4  | <b>2,12 [1,52; 2,57]</b>  | 3  |
| <b>Klon C mit B</b>     | -0,37 [-0,65; 0,02]       | 7  | 0,02 [-0,02; 0,12]        | 8  | -0,01 [-0,02; 0,06]       | 17 | -0,02 [-0,03; 0,11]       | 11 |
| <b>Klon C mit Bio</b>   | 0,93 [0,70; 1,12]         | 3  | 0,23 [0,09; 0,97]         | 5  | 0,44 [0,26; 0,57]         | 13 | 0,43 [0,01; 0,95]         | 8  |



**Abbildung 13: Konzentration verschiedener Klonkombinationen im Stuhl: Gesund vs. Magen-/Pancreas-/Darm-Karzinom, einzeln aufgeführt**

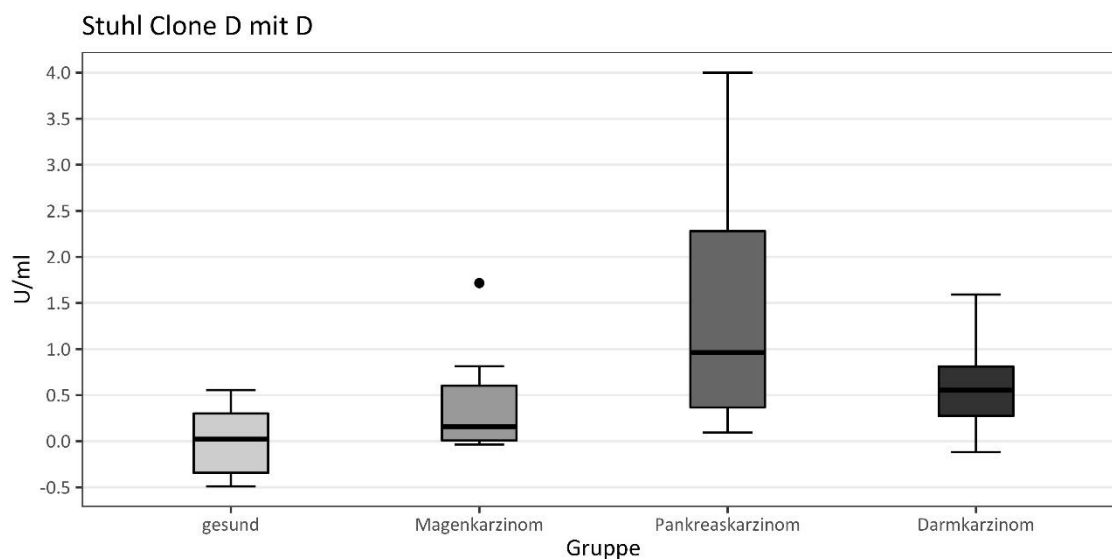


**Abbildung 14: Konzentration verschiedener Klonkombinationen im Stuhl: Gesund vs. Magen-/Pancreas-/Darm-Karzinom, Übersicht**

### 4.2.3 Statistischer Vergleich der weiteren Klonkombinationen im Stuhl

Der statistische Vergleich, der in 3.2.2. identifizierten Klonkombinationen ergab, dass einzig die Kombination D mit D signifikant zwischen den 4 Gruppen differenzieren konnte (Kruskal Wallis:  $p = 0.004$ ). Hierbei zeigte sich, dass Patienten mit einem Pancreas- oder Darmkarzinom signifikant höhere Klon D mit D-Konzentrationen aufwiesen als die gesunden Kontrollen (gesunde Kontrollgruppe: 0,02 [-0,34; 0,30] U/ml vs. Pancreas: 0,96 [0,37; 2,28] U/ml,  $p = 0,001$ ,  $r = 0,62$ ; Darm: 0,56 [0,27; 0,81] U/ml,  $p = 0,02$ ,  $r = 0,54$ , siehe Abbildung 15). Der differenzierende Effekt war dabei besonders stark für die Gruppe der Patienten mit Pancreaskarzinom. Bei Patienten mit Magenkarzinom ließ sich kein Unterschied im Vergleich zu den gesunden Kontrollen feststellen ( $p = 0,277$ ,  $r = 0,29$ ).

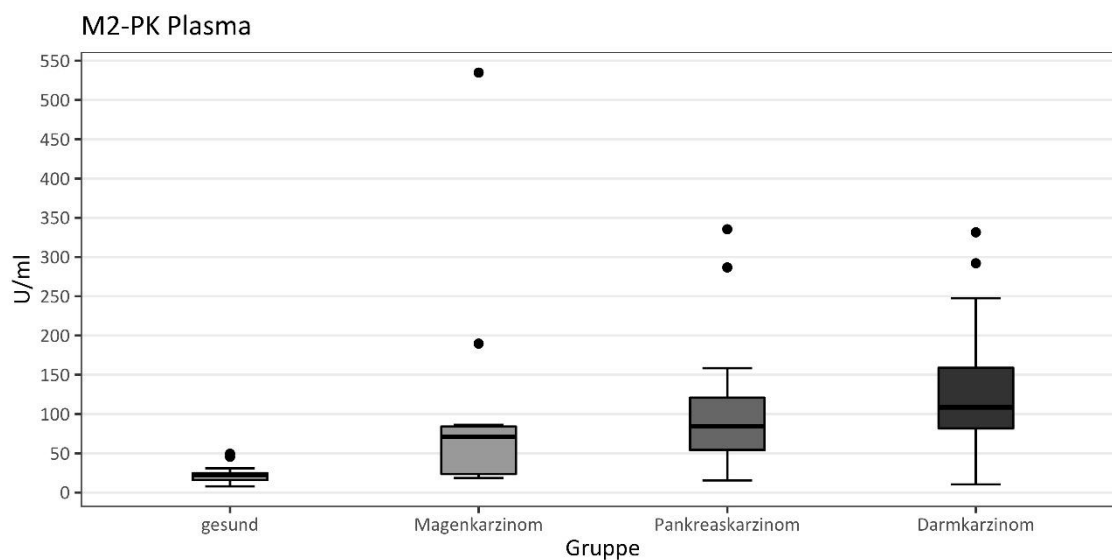
Für alle weiteren Klonkombinationen ergaben sich keine signifikanten Effekte (Kruskal Wallis: D mit C:  $p = 0,247$ , D mit B:  $p = 0,582$ , C mit D:  $p = 0,304$ , C mit C:  $p = 0,226$ , B m C:  $p = 0,142$ ).



**Abbildung 15: Konzentration Klonkombination D mit D im Stuhl: Gesund vs. Magen-/Pancreas-/ Darm-Karzinom**

#### 4.2.4 M2-PK im Plasma 4 Gruppen

Die geringste Konzentration von M2-PK im Plasma konnte mit 22,00 [15,00; 26,17] U/ml im Median bei den gesunden Patienten gefunden werden. Bei Patienten mit Magenkarzinom wurde eine Konzentration von 71,09 [23,19; 86,18] U/ml gemessen, bei Patienten mit Pankreaskarzinom von 84,31 [48,63; 124,10] U/ml und bei Patienten mit Darmkarzinom von 108,57 [67,42; 163,85] U/ml (siehe Abbildung 17 und Tabelle 16 Kon). Somit wiesen die gesunden Kontrollen eine M2-PK Konzentration innerhalb des Referenzbereichs (< 25 U/ml) auf, während Patienten mit Karzinom und Patienten mit Darmkarzinom insbesondere, deutlich erhöhte M2-PK Konzentrationen aufwiesen.



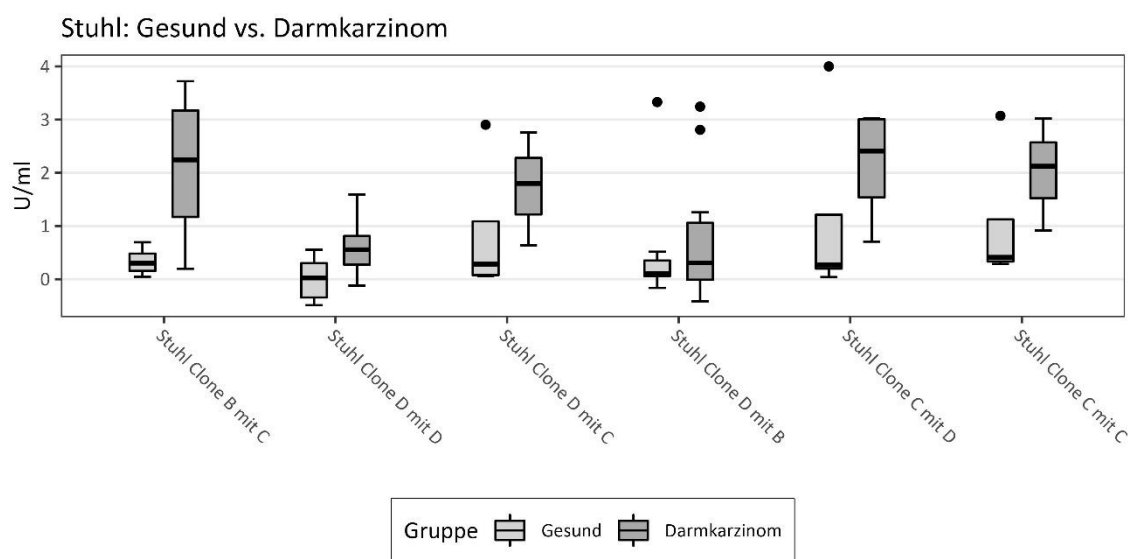
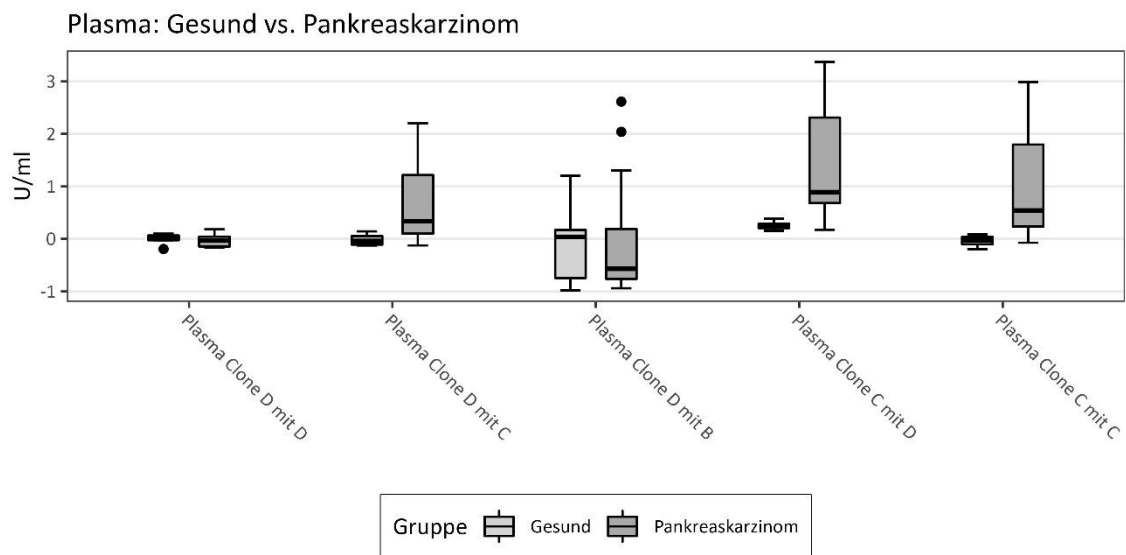
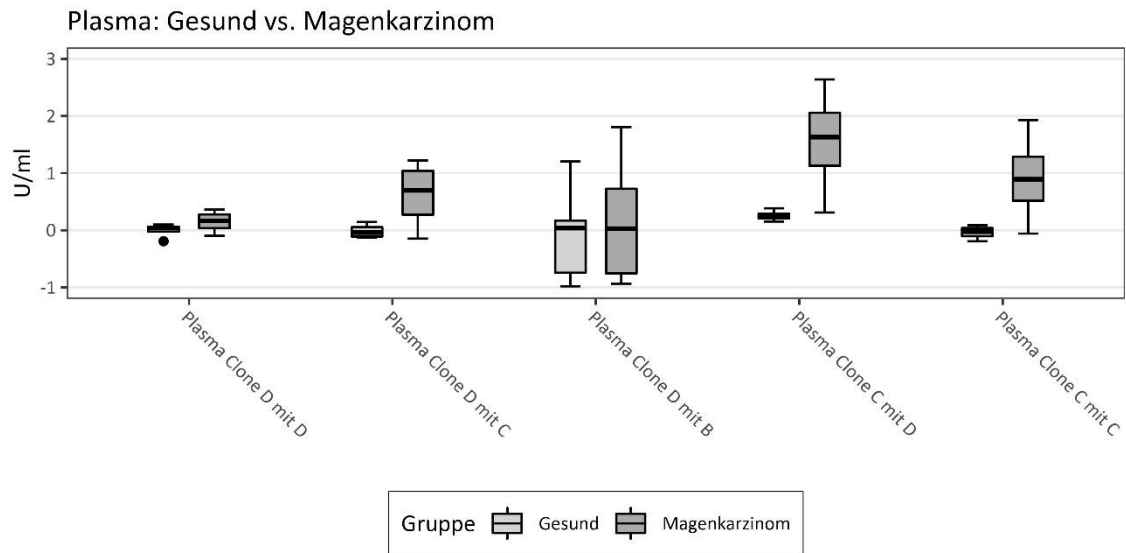
**Abbildung 16: Konzentration M2- PK im Plasma: Gesund vs. Magen-/Pancreas-/ Darm-Karzinom**

#### 4.2.5 Weitere Klonkombinationen im Plasma 4 Gruppen

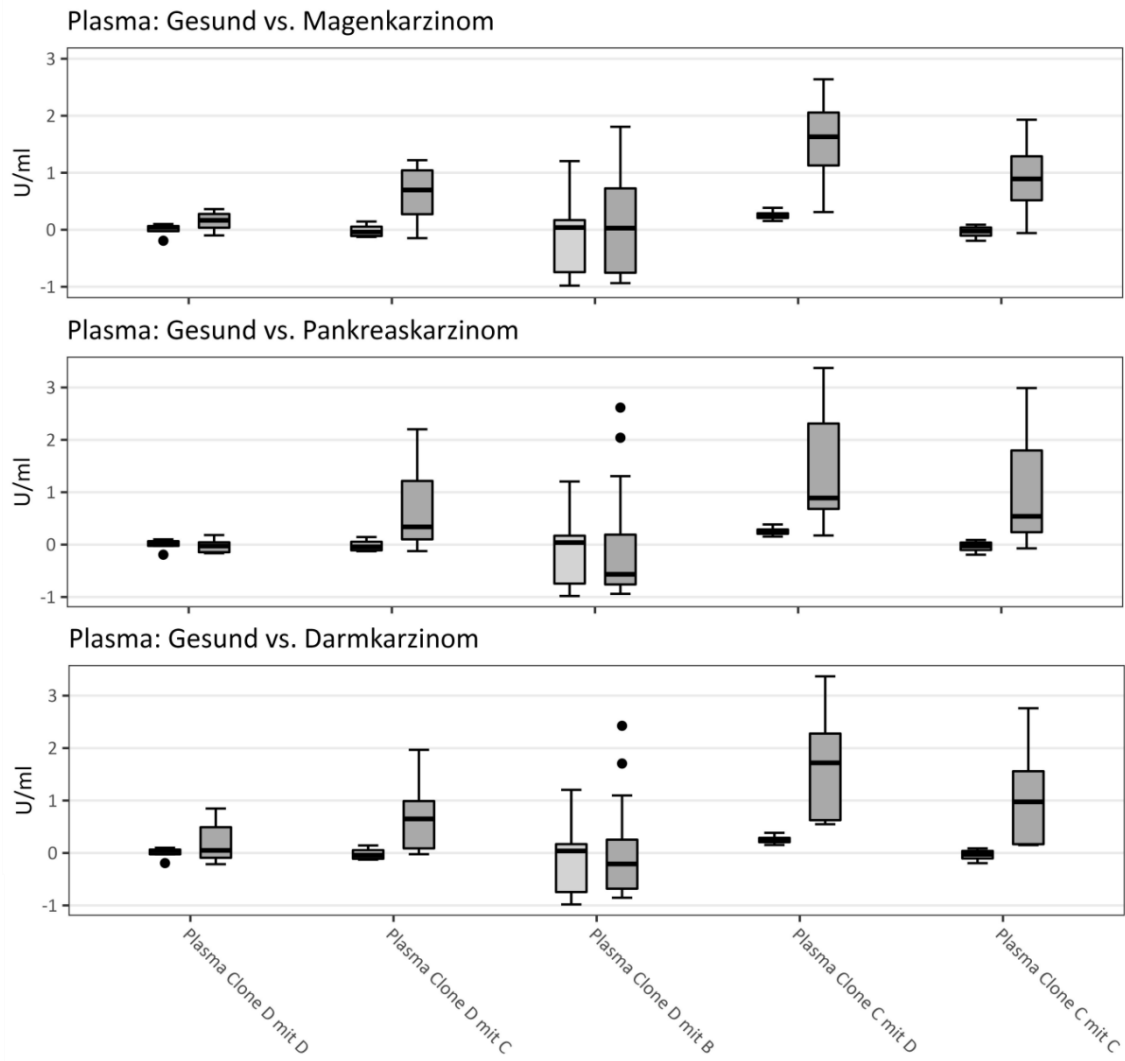
Innerhalb der weiterhin gemessen 8 Klonkombinationen im Plasma zeigte sich, dass ähnlich zum Stuhl die Klonkombinationen D mit D, D mit C, D mit B, C mit D und C mit C potenziell sensitiv auf Karzinome reagierten, da sie deskriptiv höhere Konzentrationen in Patienten mit Karzinomen aufwiesen als solche innerhalb der gesunden Kontrollen (siehe Tabelle 15). Somit qualifizierten sich diese für einen weiteren inferenzstatistischen Vergleich der Gruppen.

**Tabelle 15: Konzentration verschiedener Klonkombinationen im Plasma: Gesund vs. Magen-/Pancreas-/Darm-Karzinom**

| Plasma                | Gesunde KG                      | N         | Magenkarzinom             | N        | Pankreaskarzinom           | N         | Darmkarzinom               | N         |
|-----------------------|---------------------------------|-----------|---------------------------|----------|----------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| <b>M2PK im Plasma</b> | 22,00<br>[16,00;<br>24,70]      | 17        | 71,09 [23,60; 84,06]      | 11       | 84,31 [54,18; 120,81]      | 26        | 108,57 [81,61; 158,83]     | 23        |
| <b>Klon B mit D</b>   | 0,26 [0,14;<br>0,44]            | 12        | 0,26 [0,18; 0,45]         | 8        | 0,12 [0,07; 0,18]          | 24        | 0,12 [0,09; 0,28]          | 18        |
| <b>Klon B mit C</b>   | 0,10 [-0,00;<br>0,28]           | 4         | -0,07 [-0,13; 0,14]       | 4        | -0,16 [-0,21; -0,07]       | 8         | -0,13 [-0,21; 0,34]        | 7         |
| <b>Klon D mit D</b>   | <b>0,04 [-0,03;<br/>0,07]</b>   | <b>4</b>  | <b>0,17 [0,04; 0,28]</b>  | <b>4</b> | <b>-0,03 [-0,15; 0,04]</b> | <b>8</b>  | <b>0,05 [-0,09; 0,49]</b>  | <b>7</b>  |
| <b>Klon D mit C</b>   | <b>-0,04 [-<br/>0,11; 0,05]</b> | <b>4</b>  | <b>0,70 [0,27; 1,04]</b>  | <b>4</b> | <b>0,34 [0,10; 1,22]</b>   | <b>8</b>  | <b>0,65 [0,09; 0,99]</b>   | <b>7</b>  |
| <b>Klon D mit B</b>   | <b>0,04 [-0,74;<br/>0,17]</b>   | <b>12</b> | <b>0,03 [-0,76; 0,73]</b> | <b>8</b> | <b>-0,57 [-0,76; 0,19]</b> | <b>24</b> | <b>-0,21 [-0,68; 0,26]</b> | <b>18</b> |
| <b>Klon C mit D</b>   | <b>0,24 [0,21;<br/>0,29]</b>    | <b>4</b>  | <b>1,63 [1,13; 2,06]</b>  | <b>4</b> | <b>0,89 [0,68; 2,31]</b>   | <b>8</b>  | <b>1,72 [0,63; 2,28]</b>   | <b>7</b>  |
| <b>Klon C mit C</b>   | -0,03 [-<br>0,10; 0,04]         | 4         | 0,89 [0,52; 1,29]         | 4        | 0,54 [0,24; 1,80]          | 8         | 0,98 [0,17; 1,56]          | 7         |



**Abbildung 17: Konzentration verschiedener Klonkombinationen im Plasma: Gesund vs. Magen-/Pancreas-/ Darm-Karzinom, einzeln aufgeführt**

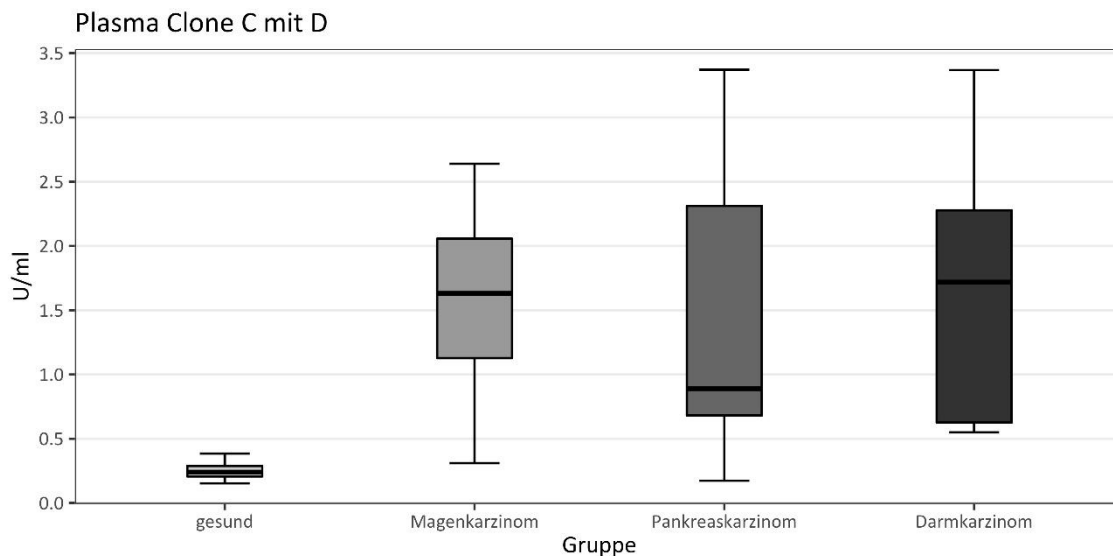


**Abbildung 18: Konzentration verschiedener Klonkombinationen im Plasma: Gesund vs. Magen-/Pancreas-/ Darm-Karzinom, Übersicht**

#### 4.2.6 Statistischer Vergleich der weiteren Klonkombinationen im Plasma

Der statistische Vergleich, der in 3.2.5. identifizierten Klonkombinationen ergab, dass einzig die Kombination C mit D marginal signifikant zwischen den 4 Gruppen differenzieren konnte (Kruskal Wallis:  $p = 0.052$ ). Hierbei zeigte sich, dass alle Karzinomgruppen signifikant höhere Klon C mit D-Konzentrationen aufwiesen als die gesunden Kontrollen (Magen: 1,63 [1,13; 2,06] U/ml,  $p = 0,043$ ,  $r = 0,71$ ; Pancreas: 0,89 [0,68; 2,31] U/ml,  $p = 0,027$ ,  $r = 0,64$ ; Darm: 1,72 [0,63; 2,28] U/ml,  $p = 0,006$ ,  $r = 0,80$ ; gesunde Kontrollgruppe: 0,24 [0,21; 0,29] U/ml, siehe Grafik 19). Der differenzierende Effekt war dabei besonders stark für die Gruppe der Patienten mit Darmkarzinom.

Für alle weiteren Klonkombinationen ergaben sich keine signifikanten Effekte (Kruskal Wallis: D mit C:  $p = 0,279$ , D mit B:  $p = 0,787$ , D mit D:  $p = 0,465$ , C mit C:  $p = 0,078$ ).



**Abbildung 19: Konzentration Klonkombination C mit D im Plasma: Gesund vs. Magen-/Pancreas-/Darm-Karzinom**

## 5 Diskussion

### 5.1 M2-PK im Stuhl bei Gesunden vs. Patienten mit Karzinom

Die gemessenen M2-PK-Werte für die Kontrollgruppe als auch für die Gruppe der Patienten mit Karzinom lag im erwarteten Referenzbereich [Hardt & Ewald, 2008; Ewald et al, 2007]. Die erhöhte Streuung in der Gruppe der Karzinompatienten entspricht ebenfalls den Erwartungen, da es sich einerseits um eine heterogene Gruppe mit verschiedenen Typen von Karzinomen handelt. Zum anderen führt ein Karzinom zu einer unbestimmten Erhöhung der M2-PK-Werte, so dass naturgemäß eine entsprechende Variabilität zu verzeichnen ist.

Bei einer differenzierten Analyse im Hinblick auf die unterschiedlichen Karzinomtypen ergibt sich, dass Patienten mit Pankreas- oder Darmkarzinom einen M2-PK-Wert zeigen, welcher im Median leicht oberhalb des Referenzbereichs lag. Für Pankreas-Karzinome wurden in der jüngeren Vergangenheit erhöhte M2-PK-Werte berichtet [Bandara, Baltatzis, Sanyal & Siriwardena, 2018]. Bei Darmkarzinomen ist die Studienlage nichts ganz eindeutig, aber eine Meta-Studie unterstützt ebenfalls erhöhte M2-PK-Werte [Tonus, Sellinger, Koss & Neupert, 2012]. Im Gegensatz dazu zeigte die differenzierte Analyse bei Patienten mit Magenkarzinomen Werte im Bereich des Normwertes, was sich mit der bisherigen Datenlage deckt [Hardt, Toepler, Ngoumou, Rupp & Kloer, 2003].

Der Vergleich verschiedener klonaler Antikörperkombinationen identifizierte zwei verschiedene Paarungen, die zwischen Gesunden und Kranken unterscheiden konnten, nämlich die Kombinationen D-D und B-C. Die statistische Auswertung ergab, dass die Kombination B-C eine größere Effektstärke aufwies, aber die Kombination D-D eine höhere statistische Signifikanz zeigte. In der Zukunft sind weitere Experimente von Nöten, um die bessere Antikörper-Paarung zu identifizieren, da insbesondere für die Kombination D-D dreimal mehr Proben untersucht wurden als für die Kombination B-C (42 Proben vs. 14 Proben).

Bei einer genaueren Untersuchung der verschiedenen Antikörperpaarungen zeigt sich, dass die Kombination D-D insbesondere bei Patienten mit Pankreaskarzinom einen statistisch signifikant hohen Effekt detektierte. Bei Darmkarzinomen war der Effekt deutlich geringer ausgeprägt, während bei Magenkarzinomen kein Unterschied mehr nachgewiesen werden konnte. Dieses Ergebnis unterstützt jüngere Studienergebnisse und deutet auf einen Ansatz

hin, der möglicherweise zum Screening von Pankreaskarzinomen eingesetzt werden kann. Hierzu sind jedoch eine Vielzahl von Folgestudien notwendig. Ein erster Schritt wäre eine Vergrößerung der Patientenzahl und ein Vergleich mit etablierten Tumormarkern, z.B. CA 19-9, wie er bereits in anderen Studien angestellt wurde [Schneider & Schulze, 2003].

## **5.2 M2-PK im Plasma bei Gesunden vs. Patienten mit Karzinom**

Wie bereits bei den Stuhlproben, lagen auch bei den Plasmaproben die gemessenen M2-PK-Werte im erwarteten Referenzbereich für Gesunde und Patienten (Hardt et al, 2000; Schulze, 2000; Schneider et al, 2003; Schneider & Schulze, 2003). Ebenso zeichnen sich die Ergebnisse durch die antizipierte erhöhte Streuung in der Gruppe der Karzinompatienten aufgrund der Heterogenität und der Erhöhung des M2-PK-Wertes.

Die differenzierte Analyse nach Karzinomtyp zeigte, dass insbesondere Patienten mit Darmkarzinom einen deutlich erhöhten M2-PK-Wert aufwiesen. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen der Stuhlproben und stimmt mit dem aktuellen Stand der Literatur überein (Hardt, Toepler, Ngoumou, Rupp & Kloer, 2003; Bandara, Baltatzis, Sanyal & Siriwardena, 2018; Tonus, Sellinger, Koss & Neupert, 2012).

Der statistische Vergleich möglicher klonaler Antikörperkombinationen ergab zwei Paarungen, welche signifikant in der Lage waren, zwischen Gesunden und Kranken zu unterscheiden: die Kombination C-D und C-C. Beide Kombinationen zeigten eine starke Effektstärke. Die Kombination D-C scheiterte knapp an der statistischen Signifikanz und wies eine mittelgroße Effektstärke auf. Für alle drei Kombinationen wurden jeweils insgesamt 23 Proben analysiert, so dass hier keine Verzerrung zu Gunsten einer bestimmten Kombination vorlag. Allerdings ist die Zahl der Proben relativ klein in Anbetracht der Gesamtzahl an Plasmaproben von 77.

Eine detaillierte Betrachtung der verschiedenen Antikörperkombinationen nach Karzinomtyp ergab, dass die Kombination C-D marginal signifikant zwischen den vier einzelnen Gruppen (also Gesund, Magenkarzinom, Pankreaskarzinom und Darmkarzinom) differenzieren konnte, insbesondere bei Patienten mit Darmkarzinom. Allerdings war die Kombination nicht in der Lage zwischen den einzelnen Karzinomtypen mit hinreichender statistischer Signifikanz zu unterscheiden, so dass bei der Analyse schlussendlich nur einer Unterscheidung zwischen gesund und krank möglich ist. An dieser Stelle sei erwähnt, dass erhöhte Tumor M2-PK-

Werte im EDTA-Plasma in der Vergangenheit jedoch vereinzelt auch bei Patienten ohne maligne Grunderkrankung beschrieben wurden. Die Erhöhung zeigte sich im Rahmen akuter oder chronischen Pankreatitiden sowie bei akuten Schüben einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung. Dieser Effekt ist wiederum bei der Untersuchung von Stuhl, Urin sowie Pankreassekreten bei asymptomatischen Patienten nicht zu erwarten (Hardt P.D., Ngoumou B., Rupp J., Schnell-Kretschmer H., Klör H.U. (2000)). Inwieweit ein maligner raumfordender Prozess zum Zeitpunkt der Blutentnahme eine evtl. Begleitentzündung eines der am Verdauungsprozesses beteiligten Organe ausgelöst hat und so ebenfalls zur Erhöhung der Tumor M2-PK im Blut geführt haben könnte lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt nicht mehr sicher bestimmen.

Bei der Evaluation der Kombination C-D wurden insgesamt 34 Proben untersucht, also etwa die Hälfte aller Proben, die mit dem Referenz-ELISA auf M2-PK untersucht wurden. Auch hier gilt, wie oben bei den Stuhlproben erwähnt, dass eine Vergrößerung der Patientenzahl und ein Vergleich mit etablierten Tumormarkern ein naheliegender nächster Schritt für die Validierung der gefundenen Ergebnisse darstellt.

### **5.3 Limitationen und methodische Einschränkungen**

Eine bedeutende Limitation der hier präsentierten Arbeit ist die Größe der verfügbaren Patientenkohorte und der entsprechenden Proben. Für die Stuhlanalyse waren insgesamt Proben von lediglich 22 Gesunden und 51 Kranken verfügbar, während für Plasmauntersuchungen auf Probenmaterial von nur 17 Gesunden und 60 Krebspatienten zurückgegriffen werden konnte. Zudem war die Materialmenge der Stuhlproben für ein Testung mit allen möglichen Antikörperkombinationen teilweise unzureichend. Weiterhin mussten im Rahmen dieser Arbeit Plasmaproben verworfen werden, da diese hämolytisch wurden. Durch diese schlussendlich beschränkte Anzahl an nutzbaren Patientenproben lässt sich die hohe Variabilität der statistischen Analyse erklären, welche eine robuste Interpretation der gewonnenen Daten erschwert.

Durch eine Erweiterung der Kohorte, z.B. durch zusätzliche Aufnahme von Patienten und gesunden Probanden oder durch die Zusammenarbeit mit anderen klinischen Einrichtungen, können mehr Daten erhoben werden, welche adäquate Schlussfolgerungen erlauben würden.

Weitere Einschränkungen waren die Probenentnahme und -lagerung. Wie oben erwähnt wurden Plasmaproben hämolytisch und damit nicht nutzbar. Dies ist vor allem auf inadäquate Transportzeiten zurückzuführen, die u.a. dadurch bedingt sind, dass sich das Labor nicht innerhalb der UKGM befindet. Die Lagerung und Weiterverarbeitung der Proben stellt eine weitere Störquelle dar. Stuhlproben wurden in einem Gemeinschaftskühlschrank gelagert, welcher aufgrund häufiger Nutzung keine konstanten Temperaturen gewährleisten konnte. Die Weiterverarbeitung der Proben im Labor erfolgte teilweise erst nach 3 bis 4 Wochen, wodurch die Proben über diesen Zeitraum Temperaturschwankungen unterworfen waren, welche die Datenqualität beeinträchtigt haben konnte. Zukünftig ist eine Verbesserung und Vereinheitlichungen der Probenentnahme, -verarbeitung und Analyse mit möglichst minimaler Lagerungszeit unabdingbar, um eine hinreichende Qualität des Ausgangsmaterials und damit der erhobenen Daten zu garantieren.

#### **5.4 Ausblick**

In zukünftigen Studien sollten die oben genannten technischen Limitationen angegangen werden, also eine Vergrößerung der Probenzahl, z.B. durch Vernetzung mit anderen klinischen Zentren, sowie eine Optimierung der Prozesse zur Probengewinnung und Verarbeitung. Im Rahmen dessen wäre eine weitere Überlegung beispielsweise die systematische Evaluation verschiedener Antikörperkombinationen *in vitro* unter definierten Bedingungen durchzuführen, z.B. unter Nutzung eines standardisierten, rekombinant hergestellten tetrameren M2-PK-Proteinkomplexes. Eine erfolgreiche Expression und Aufreinigung jenes Proteinkomplexes wurde bereits beschrieben und sollte damit machbar sein (Anastasiou et al, 2012).

Daneben finden sich weitere Möglichkeiten zur Charakterisierung von Tumormarkern und der Entwicklung zugehöriger Immundetektionsverfahren. In der vorliegenden Studie wurden Patienten in bis zu vier Gruppen eingeteilt, nämlich in Gesunde, Patienten mit Pankreaskarzinom, mit Darmkarzinom und mit Magenkarzinom. Innerhalb der Gruppen wurde beispielsweise aber nicht weiter nach Subtyp und Grad des Karzinoms unterschieden. Da der Erfolg von Biomarkern und deren Nachweis auch von der Homogenität der Gruppen abhängt, ist es angezeigt, in weiteren Studien die Patienten weiter zu unterteilen. Zahlreiche Studien weisen darauf hin, dass sich Tumormarker nach Ursprung des Tumors unterscheiden und sich auch im Laufe der Krebsentwicklung und Krebstherapie ändern (Danila et al, 2011;

Cervera & Flejou, 2011). Durch eine höhere Differenzierung der Patienten nach dem vorliegenden Karzinom könnte sich die Variabilität der M2-PK-Messungen verringern bzw. die Genauigkeit verbessern. Die Voraussetzung für solche eine Untersuchung ist allerdings die Verfügbarkeit einer hinreichend großen Patientenkohorte.

In dieselbe Schlagrichtung zielt auch die Überlegung, einzelne Tumormarker, wie eben M2-PK, nicht als einzelnen Wert zu betrachten, sondern diesen als Teil eines größeren Pools an Biomarkern zu betrachten. Die Erhebung weiterer Biomarker erlaubt die robustere Überwachung der Patienten im Rahmen der Vorsorgeuntersuchungen und im Zuge der Therapienachsorge. Auch hier zeigen Studien sehr deutlich, dass ein Bündel an Tumormarkern einen größeren Erfolg in der Erkennung und Behandlung von Krebserkrankungen hat (Syn et al, 2016). In diesem Rahmen kann M2-PK ein bedeutender Teil im Screening für gastrointestinalen Tumorerkrankungen sein. Unterstützung erfährt dieses Argument in der suboptimalen Sensitivität der bisherigen M2-PK-ELISA-Verfahren für verschiedene Tumore, z.B. kolorektales Adenom (Kim et al, 2015). Dies zeigt, dass ein Wert alleine immer die Gefahr birgt, falsch-negative Ergebnisse zu liefern. Dies kann durch die Kombination verschiedener Tumormarker reduziert werden.

In einer vergleichenden Studie von Schneider und Schulz wurde bereits im Jahr 2003 diskutiert, ob durch eine Kombination der Tumor M2-PK mit CA 19-9 eine Steigerung der Sensitivität möglich wäre. Damals zeigte sich bei den Pankreaskarzinomen für CA 19-9 mit 87,5% eine höhere Sensitivität als für die TU M2-PK mit 72,9%. Maligne Neoplasien der Bauchspeicheldrüse werden durch die meist fehlenden Symptome erst spät erkannt, infolge liegt die 5-Jahres-Überlebensrate beim Pankreaskarzinom unter allen Krebserkrankungen in Deutschland. Ein neuer Ansatz wäre hier die Kombination der Klonvarianten D-D der M2-PK im Stuhl, welche eine statistisch erhöhte Signifikanz zur Detektion von Pankreastumoren auswies, mit dem Tumormarker CA19-9 in Hinblick der Möglichkeit eines nicht- invasiven, flächendeckenden Screeningverfahrens in Form einer einfachen Blutentnahme in Kombination mit einer Stuhlprobe zur Früherkennung von Pankreaskarzinomen.

Für das Magenkarzinomen steht ebenfalls keine etablierte Früherkennungsmaßnahme zur Verfügung, obwohl das Magenkarzinome weltweit betrachtet die fünfthäufigste Krebserkrankung darstellt. Sicheren Aufschluss über eine Erkrankung kann aktuell nur eine Gastroskopie erbringen, ein zuverlässiges immunologischer Testverfahren ist bisher auf dem Markt nicht erhältlich. In Untersuchungen war die Sensitivität von TU M2-PK (57,0%)

vergleichbar zur der von CA 72-4 (60,7%), gefolgt von CA 19-9 mit 45,5% und CEA von 23,8%. Hardt et al. (2003) konnte auf Basis des M2-PK durch zusätzlichen Antikörperkombination von Klon 1 und Klon 3 eine signifikante Erhöhung der fäkalen PK bei Patienten mit Magenkrebs in 80% der Fälle auf ( $p = 0,005$ ) nachweisen. Damit erwies sich der Kombinationstest für ein spezielles Screening auf Magentumoren als geeignet (Hardt, Toepler, Ngoumou, Rupp, & Kloer, 2003).

Beim KRK hingegen ist seit 2003 eine sinkende Inzidenzrate in Deutschland in den Altersgruppen ab 55 Jahren zu verzeichnen. Die sinkenden Fallzahlen sind mutmaßlich auf die seit 2002 bundesweit etablierten Darmspiegelung zur Früherkennung zurückzuführen. 2020 nahmen jedoch nur 20% der Vorsorgeberechtigten das Angebot einer Darmspiegelung in Anspruch (Scientific Institute of the AOK, 2020). Als mögliche Gründe hierfür anzuführen sind zum einen die Invasivität einer Koloskopie und die damit verbunden Unannehmlichkeiten, sowie die oftmals fehlenden Symptome im Frühstadium einer Darmkrebserkrankung und die damit einhergehende unterschätzte Notwendigkeit.

Durch den seit 2017 gesetzlich eingeführten Blutnachweis im Stuhl mittels quantitativen immunologischen Tests (i-FOBT) steht eine nichtinvasive, kostengünstige Alternative zur Koloskopie zu Verfügung. Aufgrund geringerer Sensitivität und Spezifität kann der alleinige Einsatz jedoch nur eingeschränkt empfohlen werden, eine Kombination mit dem bereits etablierten M2- PK sowie neuer Klon-Kombination der M2- PK könnte die Signifikanz entscheidend verbessern und so mehr Menschen zur Koloskopie bewegen oder vor einem überflüssigen invasiven Eingriff bewahren.

Ziel weiterführender Studien sollte sein, in wie weit die neuen Antikörperkombinationen des M2-PK mit anderen Tumormarkern korreliert und diese ggf. ergänzt um so zur Detektion gastrointestinaler Tumorentitäten zu dienen.

## 6 Zusammenfassung

Die gastrointestinalen Tumorerkrankungen gehören zu den häufigsten Malignomen in Deutschland. Allein das kolorektale Karzinom stellt in Deutschland für beide Geschlechter die zweithäufigste Tumorerkrankung dar. Magenkarzinom, Ösophaguskarzinom und Pankreaskarzinom gehören ebenfalls zu den quantitativ bedeutsamen gastrointestinalen Tumoren. Während für die drei zuletzt genannten Entitäten bisher keine Vorsorgestrategien bestehen, sind wegen der quantitativen Bedeutung für das kolorektale Karzinom seit 2002 entsprechende Vorsorgeuntersuchungen etabliert worden.

Es ist bekannt, dass Tumoren über spezifische Stoffwechseleigenschaften verfügen, das sogenannte "Tumormetabolom". Diese führten zur Etablierung des heute noch kommerziell erhältlichen Tumor M2-PK Tests für kolorektale Karzinome. Durch die Entwicklung eines kostengünstigen und nicht-invasiven Tests mit gleichzeitig hoher Sensitivität und Spezifität ist die Bestimmung der Tumor M2-Pyruvatkinase ein bedeutendes Diagnostikum in der Krebsfrüherkennung geworden.

Bereits im Rahmen früherer Forschungen wurden einige Untersuchungen angestellt, um mit verschiedenen Antikörperkonstellationen gegebenenfalls weitere vielversprechende Marker entwickeln zu können. Diese damals unterbrochene Aktivität wurde mit Unterstützung der Firma ScheBo Biotech nun systematisch, bei verschiedenen GI-Tumoren wiederaufgenommen. Ziel ist es mittels ELISA weitere monoklonale Antikörper-Kombinationen der Pyruvatkinase zu testen, welche bei der Detektion anderer gastrointestinaler Tumoridentitäten dienen könnten.

Die vorliegende Arbeit stellt eine monozentrische, kontrollierte prospektive Datenanalyse dar. Insgesamt wurden 82 Personen eingeschlossen (60 Karzinompatienten, davon 11 Magenkarzinome, 26 Pankreaskarzinome und 23 Darmkarzinome sowie 22 gesunde Kontrollen). Nach gründlicher Aufklärung erfolgte eine Blutentnahme, sowie Stuhlprobenabgabe.

Die gemessenen M2-PK-Werte für die Kontrollgruppe als auch für die Gruppe der Patienten mit Karzinom lagen sowohl bei den Stuhl-, wie auch den Plasma-Proben im erwarteten Referenzbereich.

Bei einer differenzierten Analyse im Hinblick auf die unterschiedlichen Karzinomtypen ergibt sich, dass Patienten mit Pankreas- oder Darmkarzinom einen M2-PK-Wert zeigen, welcher im Median leicht oberhalb des Referenzbereichs lag.

Der Vergleich verschiedener klonaler Antikörperkombinationen innerhalb der Stuhlproben identifizierte zwei verschiedene Paarungen, die zwischen Gesunden und Kranken unterscheiden konnten, die Kombinationen D-D und B-C. Insbesondere die Kombination D-D konnte bei Patienten mit Pankreaskarzinom einen statistisch signifikant hohen Effekt detektieren. Dieses Ergebnis deutet auf einen Ansatz hin, der möglicherweise zum Screening von Pankreaskarzinomen eingesetzt werden könnte. Ein erster Schritt wäre eine Vergrößerung der Patientenzahl und ein Vergleich mit etablierten Tumormarkern, z.B. CA 19-9.

Die Plasmaprobeanalyse ergab zwei Paarungen, welche signifikant in der Lage waren, zwischen Gesunden und Kranken zu unterscheiden: die Kombination C-D und C-C. Beide Kombinationen zeigten eine starke Effektstärke. Eine Betrachtung der Antikörperkombinationen nach Karzinomtyp ergab, dass die Kombination C-D marginal signifikant zwischen den vier einzelnen Gruppen (Gesund, Magenkarzinom, Pankreaskarzinom und Darmkarzinom) differenzieren konnte, insbesondere bei Patienten mit Darmkarzinom. Auch hier gilt, wie bei den Stuhlproben erwähnt, dass eine Vergrößerung der Patientenzahl und ein Vergleich mit etablierten Tumormarkern ein naheliegender nächster Schritt für die Validierung der gefundenen Ergebnisse darstellt.

## 7 Summary

Gastrointestinal cancers are among the most common malignancies in Germany. Colorectal carcinoma alone is the second most common tumor disease for both sexes in Germany.

Gastric cancer, esophageal cancer, and pancreatic cancer are also significant gastrointestinal tumors. While there are no current screening strategies for the latter three types, since 2002, screening measures have been established for colorectal cancer due to its prevalence.

Tumors have specific metabolic characteristics, known as the "tumor metabolome," which led to the development of the commercially available Tumor M2-PK test for colorectal cancers. The creation of a cost-effective, non-invasive test with high sensitivity and specificity has made the measurement of Tumor M2-Pyruvate Kinase a significant diagnostic tool in early cancer detection.

Earlier research investigated various antibody combinations to potentially develop additional promising markers. This interrupted activity has been systematically resumed with the support of ScheBo Biotech to test further monoclonal antibody combinations of pyruvate kinase using ELISA, aiming to detect other gastrointestinal tumor types.

This study presents a monocentric, controlled prospective data analysis. A total of 82 individuals were included (60 cancer patients: 11 with stomach cancer, 26 with pancreatic cancer, 23 with colorectal cancer, and 22 healthy controls). After medical clarification, blood and stool samples were collected.

The measured M2-PK values for the control group as well as for the group of patients with carcinoma were in the expected reference range.

A differentiated analysis with regard to the different types of carcinoma shows that patients with pancreatic or colon carcinoma show an M2-PK value that was slightly above the reference range in the median. Comparing various clonal antibody combinations in stool samples identified two pairings, D-D and B-C, that could distinguish between healthy and sick individuals. The D-D combination showed a statistically significant effect in detecting pancreatic cancer. This result suggests a potential approach for pancreatic cancer screening. The next step would be to increase the sample size and compare with established tumor markers, such as CA 19-9.

The plasma sample analysis showed two pairings that were significantly able to distinguish between healthy and sick people: the combination C-D and C-C. Both combinations showed a strong effect size. Analysis of antibody combinations by cancer type showed that the C-D combination could marginally differentiate between the four groups (healthy, stomach cancer, pancreatic cancer, and colorectal cancer), especially in colorectal cancer patients. As with the stool samples, increasing the patient number and comparing with established tumor markers is a logical next step for validating the results.

## 8 Literaturverzeichnis

- Ahmed, A., Dew, T., Lawton, F., Papadopoulos, A., Devaja, O., & Raju, K. (2007). M2-PK as a novel marker in ovarian cancer. A prospective cohort study. *Eur J Gynaecol Oncol.*, S. (28):83-88.
- AMBOSS. (2020). *Fachwissen für Mediziner im ärztlichen Alltag und Studium; Tumormarker*. Abgerufen am 26. März 2021 von <https://www.amboss.com/de/wissen/Tumormarker>.
- Anastasiou D, Yu Y, Israelsen WJ, Jiang JK, Boxer MB, Hong BS, Tempel W, Dimov S, Shen M, Jha A, Yang H, Mattaini KR, Metallo CM, Fiske BP, Courtney KD, Malstrom S, Khan TM, Kung C, Skoumbourdis AP, Veith H, Southall N, Walsh MJ, Brimacombe KR, Leister W,. Pyruvate kinase M2 activators promote tetramer formation and suppress tumorigenesis. *Nat Chem Biol.* 2012 Dec;8(12):1008. PMID: 22922757;.
- Arnold, M., Sierra, M., Laversanne, M., & Soerjomataram, I. (2017). Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*, S. (66):683-691.
- Aryal, S. (2020). *Microbe Notes; Sandwich ELISA- Steps and Advantages*. Abgerufen am 27. März 2021 von <https://microbenotes.com/sandwich-elisa-steps-and-advantages/>.
- Bandara, I., Baltatzis, M., Sanyal, S., & Siriwardena, A. (2018). Evaluation of tumor M2-pyruvate kinase (Tumor M2-PK) as a biomarker for pancreatic cancer. *World J Surg Oncol*, S. 16(1):56.
- Blot, W., & Tarone, R. (2018). Esophageal cancer. In M. Thun, M. Linet, C. Cerhan, D. Haiman, & S. Schottenfeld, *Cancer Epidemiology and Prevention. 4th ed.* (S. 579-592). New York:: Oxford University Press.
- Boros, L., Cascante, M., & Lee, W. (2002). Metabolic profiling of cell growth and death in cancer: applications in drug discovery. *Drug Discov. Today.*, S. (7):364-372.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R., A Torre, L., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, S. 68(6):394-424.
- Brinck, U., Fischer, G., Eigenbrodt, E., Oehmke, M., & Mazurek, S. (1994). L-and M 2-pyruvate kinase expression in renal cell carcinomas and their metastases. *Virchows Archiv*, S. (424):177-185.
- Cervera P, Fléjou JF. Changing pathology with changing drugs: tumors of the gastrointestinal tract. *Pathobiology.* 2011;78(2):76-89. doi: 10.1159/000315535. Epub 2011 Jun 15.

PMID: 21677471.

- Chen, Y., & Jia, W. (2016). A comprehensive genomic characterization of esophageal squamous cell carcinoma: from prognostic analysis to in vivo assay. *Chin J Cancer*, S. 35(1):76-83.
- Christofk, H., Vander Heiden, M., Wu, N., Asara, J., & Cantley, L. (2008). Pyruvate kinase M2 is a phosphotyrosine-binding protein. *Nature*, S. (452):181-189.
- Chung-Faye, G., Hayee, B., Maestranzi, S., Donaldson, N., Forgacs, I., & Sherwood, R. (2007). Fecal M2-pyruvate kinase (M2-PK): a novel marker of intestinal inflammation. *Inflamm Bowel Dis.*, S. (13):1374-1378.
- deMartel, C., & Parsonnet, J. (2018). *Cancer Epidemiology and Prevention*. 4th ed. . *New York: Oxford University Press*, S. 593-610.
- Danila DC, Fleisher M, Scher HI. Circulating tumor cells as biomarkers in prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2011 Jun 15;17(12):3903-12. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2650. PMID: 21680546; PMCID: PMC3743247
- Ding, S., Li, Y., Shao, X., Zhou, H., Zeng, R., & Tang, Z. (2004). Proteome analysis of hepatocellular carcinoma cell strains, MHCC97-H and MHCC97-L, with different metastasis potentials. *Proteomics.*, S. (4):982-994.
- Dunne, R., & Hezel, A. (2015). *Genetics and Biology of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*. *Hematol Oncol Clin North Am.*, S. (29):595-608.
- Ewald N, Schaller M, Bayer M, Akinci A, Bretzel RG, Kloer HU, Hardt PD. Fecal pyruvate kinase-M2 (tumor M2-PK) measurement: a new screening concept for colorectal cancer. *Anticancer Res*. 2007 Jul-Aug;27(4A):1949-52. PMID: 17649802.
- Ferguson, E., & Rathmell, J. (2008). New roles for pyruvate kinase M2: working out the Warburg effect. *Trends Biochem. Sci.*, S. (33):359-362.
- Fidler, M., Soerjomataram, I., & Bray, F. (2016). A global view on cancer incidence and national levels of the Human Development Index. *Int J Cancer*, S. (139):2436-2446.
- Fukuda, S., Miyata, H., Miyazaki, Y., Makino, T., Takahashi, T., Kurokawa, Y., & Yamasaki, M. (2015). Pyruvate kinase M2 modulates esophageal squamous cell carcinoma chemotherapy response by regulating the pentose phosphate pathway. *Ann Surg Oncol.*, S. 22(3):1461-1468.
- Gao, X., Wang, H., Yang, J., Chen, J., Jie, J., Li, L., & Zhang, Y. (2013). Reciprocal regulation of protein kinase and pyruvate kinase activities of pyruvate kinase m2 by growth signals. *J. Biol. Chem.*, S. (288):15971-15979.

- Gorrini, C., Harris, I., & Mak, T. (2013). Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat. Rev. Drug Discov.*, S. (12):931-947.
- Gu, Z., Xia, J., Xu, H., Frech, I., Tricot, G., & Zhan, F. (2017). NEK2 promotes aerobic glycolysis in multiple myeloma through regulating splicing of pyruvate kinase. *J Hematol Oncol.*, S. (10):17-28.
- Gupta, V., & Bamezai, R. (2010). Human pyruvate kinase M2: a multifunctional protein. *Protein Sci*, S. (19):2031-2044.
- Hardt, P., Toepler, M., Ngoumou, B., Rupp, J., & Kloer, H. (2003). Fecal pyruvate kinase concentrations (ELISA based on a combination of clone 1 and clone 3 antibodies) for gastric cancer screening. *Anticancer Res*, S. 23(2A):855-7.
- Hardt PD, Ewald N. Tumor M2 pyruvate kinase: a tumor marker and its clinical application in gastrointestinal malignancy. *Expert Rev Mol Diagn*. 2008 Sep;8(5):579-85. doi: 10.1586/14737159.8.5.579. PMID: 18785806
- Hardt PD, Ngoumou BK, Rupp J, Schnell-Kretschmer H, Kloer HU. Tumor M2-pyruvate kinase: a promising tumor marker in the diagnosis of gastro-intestinal cancer. *Anticancer Res*. 2000 Nov-Dec;20(6D):4965-8. PMID: 11326648.
- Hardt PD., Schlierbach P., Toepler M., Bretzel R.G., Klör H.U. (2004) Tumor M2-PK Stool Test: A screening tool for colorectal cancer; Poster from the Kongress für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, 22.-24.11.2004, Düsseldorf, Germany
- Herold, G. (2019). *Innere Medizin 2020*. Eigenverlag.
- Hidalgo, M. (2010). Pancreatic cancer. *N Engl J Med.*, S. (362):1605-1617.
- Hoff, G., Grotmol, T., & Thiis-Evensen, E. (2004). Testing for faecal calprotectin (PhiCal) in the Norwegian Colorectal Cancer Prevention trial on flexible sigmoidoscopy screening: comparison with an immunochemical test for occult blood (FlexSure OBT). *Gut*, S. (53):1329-1333.
- Hohenberger, A. (2017). *Bauchspeicheldrüsenkrebs – Diagnose*. (D. Krebsgesellschaft, Herausgeber) Abgerufen am 26. März 2021 von <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/bauchspeicheldruesenkrebs/diagnose.html#:~:text=Pankreaskarzinome>.
- Hoskin, T., Crowther, J., Cheung, J., Epton, M., Sly, P., Elder, P., & Dobson, R. (2019). *Oxidative cross-linking of calprotectin occurs in vivo, altering its structure and*

*susceptibility to proteolysis*. Abgerufen am 27. März 2021 von <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213231719302794>.

- Howson, C., Hiyama, T., & Wynder, E. (1986). The decline in gastric cancer: epidemiology of an unplanned triumph. *Epidemiol Rev*, S. (8):1-27.
- IARC. (2012). IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Personal habits and indoor combustions. Volume 100 E. A review of human carcinogens. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, S. (100):1-538.
- Ince, A., Yildiz, K., Baysal, B., Danalhoğlu, A., Kocaman, O., Tozlu, M., & Gangarapu, V. (2014). Roles of serum and biliary CEA, CA19-9, VEGFR3, and TAC in differentiating between malignant and benign biliary obstructions. *Turk J Gastroenterol*, S. 25(2):162-9.
- Islami, F., Goding Sauer, A., & Miller, K. (2018). Proportion and number of cancer cases and deaths attributable to potentially modifiable risk factors in the United States. *CA Cancer. J Clin.*, S. (68):31-54.
- Israelsen, W., Dayton, T., Davidson, S., Fiske, B., Hosios, A., & Bellinger, G. (2013). PKM2 isoform-specific deletion reveals a differential requirement for pyruvate kinase in tumor cells. *Cell.*, S. (155):397-409.
- Jeffery, J., Lewis, S., & Ayling, R. (2009). Fecal dimeric M2-pyruvate kinase (tumor M2-PK) in the differential diagnosis of functional and organic bowel disorders. *Inflamm Bowel Dis*, S. 15(11):1630-4.
- Keller, K., Doctor, Z., Dwyer, Z., & Lee, Y. (2014). SAICAR induces protein kinase activity of PKM2 that is necessary for sustained proliferative signaling of cancer cells. *Mol Cell.*, S. (53):700-709.
- Kim YC, Kim JH, Cheung DY, Kim TH, Jun EJ, Oh JW, Kim CW, Chung WC, Kim BW, KimSS, Kim JI, Park SH, Kim JK. The Usefulness of a Novel Screening Kit for Colorectal Cancer Using the Immunochromatographic Fecal Tumor M2 Pyruvate Kinase Test. *Gut Liver*. 2015 Sep 23;9(5):641-8. doi: 10.5009/gnl13457. PMID: 25473070; PMCID: PMC4562782
- Li, L., Peng, G., Liu, X., Zhang, Y., Han, H., & Liu, Z. (2020). Pyruvate Kinase M2 Coordinates Metabolism Switch between Glycolysis and Glutaminolysis in Cancer Cells. *iScience.*, S. 23811):101684.

- Li, W., Xu, Z., Hong, J., & Xu, Y. (2014). Expression patterns of three regulation enzymes in glycolysis in esophageal squamous cell carcinoma: association with survival. *Med Oncol*, S. 31(9):118.
- Limburg, P., Devens, M., & Harrington, J. (2003). Prospective evaluation of fecal calprotectin as a screening biomarker for colorectal neoplasia. *Am J Gastroenterol*, S. (98):2299-2305.
- Luan, W., Wang, Y., Chen, X., Shi, Y., Wang, J., & Zhang, J. (2015). PKM2 promotes glucose metabolism and cell growth in gliomas through a mechanism involving a let-7a/c-Myc/hnRNPA1 feedback loop. *Oncotarget*, S. (6):13006-13018.
- Luo, W., Hu, H., Chang, R., Zhong, J., Knabel, M., & O'Meally, R. (2011). Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1. *Cell*, S. (145):732-744.
- Magalhaes, B., Peleteiro, B., & Lunet, N. (2012). Dietary patterns and colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer Prev*. 2012; 21: 15- 23. *Eur J Cancer Prev*, S. (21):15-23.
- Masugi, Y., Yamazaki, K., Emoto, K., Effendi, K., Tsujikawa, H., Kitago, M., & Itano, O. (2015). Upregulation of integrin  $\beta 4$  promotes epithelial-mesenchymal transition and is a novel prognostic marker in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Lab Invest*, S. (95):308-319.
- Mazurek, S. (2010). M2-PK-Test zur Früherkennung von kolorektalen Karzinomen. *EHK*, S. (59):200-205.
- Mazurek, S. (2011). Pyruvate kinase type M2: a key regulator of the metabolic budget system in tumor cells. *Int J Biochem Cell Biol*, S. (43):969-980.
- Mizuuchi, Y., Aishima, S., Ohuchida, K., Shindo, K., Fujino, M., Hattori, M., & Miyazaki, T. (2014). Anterior gradient 2 downregulation in a subset of pancreatic ductal adenocarcinoma is a prognostic factor indicative of epithelial-mesenchymal transition. *Lab Invest*, S. (95):193-206.
- Mulder, S., van Leerdam, M., van Vuuren, A., Francke, J., Van Toorenbergen, A., Kuipers, E., & Oувendijk, R. (2007). Tumor pyruvate kinase isoenzyme type M2 and immunochemical fecal occult blood test: performance in screening for colorectal cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, S. 19(10):878-82.
- Muthas, D., Reznichenko, A., & Balendran, C. (2017). Neutrophils in ulcerative colitis: a review of selected biomarkers and their potential therapeutic implications. *Scand J Gastroenterol*, S. (52):125-135.

- Panchabhai, S., Schlam, I., Sebastian, S., & Fonseca, R. (2017). PKM2 and other key regulators of Warburg effect positively correlate with CD147 (EMMPRIN) gene expression and predict survival in multiple myeloma. *Leukemia*, S. (31):991-994.
- Papadaki, C., Sfakianaki, M., Lagoudaki, E., Giagkas, G., Ioannidis, G., & Trypaki, M. (2014). PKM2 as a biomarker for chemosensitivity to front-line platinum-based chemotherapy in patients with metastatic non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer*, S. (111):1757.
- Pezzilli, R., Barassi, A., & Morselli, L. (2008). Fecal calprotectin levels in patients with colonic polyposis. *Dig Dis Sci*, S. (53):47-51.
- Plummer, M., Franceschi, S., Vignat, J., Forman, D., & de Martel, C. (2015). Global burden of gastric cancer attributable to *Helicobacter pylori*. *Int J Cancer*, S. (136):487-490.
- Røseth, A., Fagerhol, M., & Aadland, E. (1992). Assessment of the neutrophil dominating protein calprotectin in feces. A methodologic study. *Scand J Gastroenterol*, S. (27):793-798.
- Ryan, D., Hong, T., & Bardeesy, N. (2014). Pancreatic adenocarcinoma. *N Engl J Med*, S. (371):1039-1049.
- ScheBo® Biotech AG. (2020). *ScheBo® • Pankreatische Elastase I™ Stuhltest*. Abgerufen am 27. März 2021 von <https://www.schebo.de/produkte/schebo-pankreatische-elastase-1-stuhltest/>.
- Schneider J, Schulze G. Comparison of tumor M2-pyruvate kinase (tumor M2-PK), carcinoembryonic antigen (CEA), carbohydrate antigens CA 19-9 and CA 72-4 in the diagnosis of gastrointestinal cancer. *Anticancer Res*. 2003 Nov-Dec;23(6D):5089-93. PMID: 14981971.
- Schneider J, Morr H, Velcovsky HG, Weisse G, Eigenbrodt E. Quantitative detection of tumor M2-pyruvate kinase in plasma of patients with lung cancer in comparison to other lung diseases. *Cancer Detect Prev*. 2000;24(6):531-5. PMID: 11198266.
- Schulze G. The tumor marker tumor M2-PK: an application in the diagnosis of gastrointestinal cancer. *Anticancer Res*. 2000 Nov-Dec;20(6D):4961-4. PMID: 11326647.
- Shastri, Y., Loitsch, S., Hoepffner, N., Povse, N., Hanisch, E., Rösch, W., & Mössner, J. (2008). Comparison of an established simple office-based immunological FOBT with fecal tumor pyruvate kinase type M2 (M2-PK) for colorectal cancer screening: prospective multicenter study. *Am J Gastroenterol*, S. 103(6):1496-504.

- Syn NL, Yong WP, Goh BC, Lee SC. Evolving landscape of tumor molecular profiling for personalized cancer therapy: a comprehensive review. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2016 Aug;12(8):911-22. doi: 10.1080/17425255.2016.1196187. Epub 2016 Jun 13. PMID: 27249175
- Tamada, M., Suematsu, M., & Saya, H. (2012). *Pyruvate Kinase M2: Multiple Faces for Conferring Benefits on Cancer Cells*. Abgerufen am 26. März 2021 von <https://clincancerres.aacrjournals.org/content/18/20/5554>.
- Thun, M., Wild, C., & Colditz, G. (2018). Framework for cancer Epidemiology and Prevention. 4th ed. . *New York: Oxford University Press.*, S. 1193-1204.
- Tonus, C., Sellinger, M., Koss, K., & Neupert, G. (2012). Faecal pyruvate kinase isoenzyme type M2 for colorectal cancer screening: A meta-analysis. *World J Gastroenterol.*, S. 18(30): 4004–4011.
- van Rheenen, P., Van de Vijver, E., & Fidler, V. (2010). Faecal calprotectin for screening of patients with suspected inflammatory bowel disease: diagnostic meta-analysis. *BMJ*, S. (341):3369.
- von Roon, A., Karamountzos, L., & Purkayastha, S. (2007). Diagnostic precision of fecal calprotectin for inflammatory bowel disease and colorectal malignancy. *Am J Gastroenterol*, S. (102):803-813.
- Walsham, N., & Sherwood., R. (2016). Fecal calprotectin in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Gastroenterol*, S. (9):21-29.
- Wang, C., Wang, J., Chen, Z., Gao, Y., & He, J. (2017). Immunohistochemical prognostic markers of esophageal squamous cell carcinoma: a systematic review. *Chin J Cancer*, S. (36):65.
- Wissenschaftliches Institut der AOK (Utilization of Early Detection Measures of the Statutory Health Insurance by Adult AOK-Insured Persons 2009–2018).
- Wong, N., De Melo, J., & Tang, D. (2013). PKM2, a central point of regulation in cancer metabolism. *Int J Cell Biol.*, S. (2013):242513.
- Xia, S., Feng, Z., Qi, X., Yin, Y., Jin, J., Wu, Y., & Wu, H. (2015). Clinical implication of Sox9 and activated Akt expression in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Med Oncol.*, S. (32):358-364.
- Yadav, D., & Lowenfels , A. (2013). The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology.*, S. (144):1252-1261.
- Yamazaki, K., Masugi, Y., Effendi, K., Tsujikawa, H., Hiraoka, N., Kitago, M., & Shinoda, M. (2014). Upregulated SMAD3 promotes epithelial-mesenchymal transition and

- predicts poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. . *Lab Invest*, S. (94):683-691.
- Yang, L., Venneti, S., & Nagrath, D. (2017). Glutaminolysis: a Hallmark of cancer metabolism. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, S. (19):163-194.
- Ye, X., Wang, Y., Wang, H., Feng, R., Ye, Z., Han, J., & Li, L. (2021). Can fecal calprotectin accurately identify histological activity of ulcerative colitis? A meta-analysis. *Therap Adv Gastroenterol.*, S. (14):1756284821994741.
- Zahra, K., Dey, T., Ashish, A., Mishra, S., & Pandey, U. (2020). Pyruvate Kinase M2 and Cancer: The Role of PKM2 in Promoting Tumorigenesis. *Front Oncol.*, S. (10):159.
- Zhan, C., Shi, Y., Lu, C., & Wang, Q. (2013). Pyruvate kinase M2 is highly correlated with the differentiation and the prognosis of esophageal squamous cell cancer. *Dis Esophagus Off J Int Soc Dis Esophagus ISDE*, S. 26(7):746–753.
- Zhang, X., He, C., He, C., Chen, B., Liu, Y., Kong, M., & Wang, C. (2013). Nuclear PKM2 expression predicts poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Pathol Res Pract*, S. 209(8):510–515.
- Zheng, B., Peng, J., Mollayup, A., Bakri, A., Guo, L., Zheng, J., & Xu, H. (2018). Construction of a prognostic prediction system for pancreatic ductal adenocarcinoma to investigate the key prognostic genes. *Mol Med Rep.*, S. 17(1): 216–224.

## 9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, welche zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

In erster Linie möchte ich meinem Doktorvater und Betreuer Herrn Prof Dr. med. Philip Hardt danken, für die mehrjährige und geduldige Betreuung, herausragende Fachkompetenz sowie stete Unterstützung und konstruktiver Kritik bei der Entstehung dieser Arbeit.

Großen Dank ebenfalls an die Firma ScheBo BioTech in Gießen für die labormedizinische und diagnostische Unterstützung sowie die Einarbeitung in die ELISA- Technik, insbesondere möchte ich meinen Dank an Frau Dr. Julia Grabitzki aussprechen, welche durch ihre kompetente und hilfsbereite Art zur ersten Konzeptentwicklung beitrug sowie stets motivierend zur Seite stand.

Des Weiteren Danke ich allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Klinik für Viszeralchirurgie des UGKM Gießen für die Zuarbeit und Unterstützung im Rahmen der Patientenakquise sowie Probenentnahme.

Danke an meinen Ehemann Norbert Falkenstein für deine Motivation, deine moralische Unterstützung sowie deine Liebe, die mich hat weitermachen lassen.

Danke ebenso an meine Eltern, die mich auf meinen Weg fortwährend unterstützt haben, mich stets auffingen und nie aufhörte, an mich zu glauben.

Abschließend herzlichen Dank allen Patienten und Probanden, welche mit Ihrer selbstlosen Teilnahme die Entstehung dieser Studie überhaupt erst ermöglichten.